

Aus dem Diabetes Forschungsinstitut an der

Universität Düsseldorf

- Biochemische Abteilung -

Direktor: Professor Dr. Hans Reinauer

MARKIERUNG VON NEGATIVEN FESTLADUNGEN AUF ZELLOBERFLÄCHEN
MIT KATIONISIERTEM FERRITIN
EINSATZMÖGLICHKEITEN UND GRENZEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

RALPH JENNESSEN

1982

Aus dem Diabetes Forschungsinstitut an der

Universität Düsseldorf

- Biochemische Abteilung -

Direktor: Professor Dr. Hans Reinauer

MARKIERUNG VON NEGATIVEN FESTLADUNGEN AUF ZELLOBERFLÄCHEN
MIT KATIONISIERTEM FERRITIN
EINSATZMÖGLICHKEITEN UND GRENZEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

RALPH JENNESSEN

1982

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Materialien

1.0 Chemikalien

2.0 Puffer

2.1 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

2.2 Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

3.0 Gradientenreagenzien

3.1 2,2,2-Trifluorethanol

3.2 2-Propanol

4.0 Halbleitungsfolien

Gewidmet

4.1 Silikonoxynhydrat (SiO₂)

4.2 Polysiloxan (PSi)

Meiner Tochter Jana Franziska

III. Methoden

1.1 Isolierung einer Mikroorganismenpopulation von Umweltproben und Kultivierung

2.1 Charakterisierung der Zellpopulationen

2.1.1 Bestimmung der Zellzahl und Vorkultivierung der Vitalität

2.1.2 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation in Lichtmikroskopie

2.1.3 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation in Elektronenmikroskopie

3.1 Herstellung der negativen Festfärbungen der Zelloberfläche mit Polyvinylpyrrolidon (PVP)

3.1.1 Herstellung von polyvinylpyrrolidon (PVP)

3.1.2 Abhängigkeit der PVP-Bindung von der PVP-Konzentration in Lösung

3.1.3 Markierung der Zelloberfläche mit PVP in Abhängigkeit von der Fixierung

3.1.4 Einfluss von NH₄⁺-Ionen und anderen aliphatischen Aminen

3.1.5 Spezifische Bindung der PVP-Reaktion

3.1.6 Nachweis der Zelloberfläche durch Tryptophan

3.1.7 Kontrollen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Materialien</u>	6
1.) <u>Chemikalien</u>	6
2.) <u>Puffer</u>	7
2.1 Isolierungspuffer: Hanks, isoton	7
2.2 Inkubationspuffer: Medium 199 ^R	8
3.) <u>Gradientenmedien</u>	9
3.1 Lymphoprep ^R -Gradient	9
3.2 Percoll TM -Gradient	9
4.) <u>Weitere Medien</u>	11
4.1 Glutaraldehyd/Cacodylatpuffer	11
4.2 Osmiumtetroxyd/Cacodylatpuffer	11
III. <u>Methoden</u>	12
1.) <u>Isolierung einer Mischpopulation von Lymphozyten und Monozyten</u>	12
2.) <u>Charakterisierung der Zellpopulation</u>	13
2.1 Bestimmung der Zellzahl und Beurteilung der Vitalität	13
2.2 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Lichtmikroskop	15
2.3 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Elektronenmikroskop	16
3.) <u>Darstellung der negativen Festladungen der Zelloberfläche mit kationisiertem Ferritin</u>	17
3.1 Herstellung von polykationisiertem Ferritin	17
3.2 Abhängigkeit der Fe ⁺ -Bindung von der Fe ⁺ -Konzentration im Ansatz	18
3.3 Markierung der Zelloberfläche mit Fe ⁺ in Abhängigkeit von der Fixierung	19
3.4 Einfluß von NH ₄ ⁺ -Ionen und primären aliphatischen Aminen	20
3.5 Sterische Hinderung der Fe ⁺ -Reaktion (Abbau der Zelloberfläche durch Trypsin)	21
3.6 Kontrollen	21

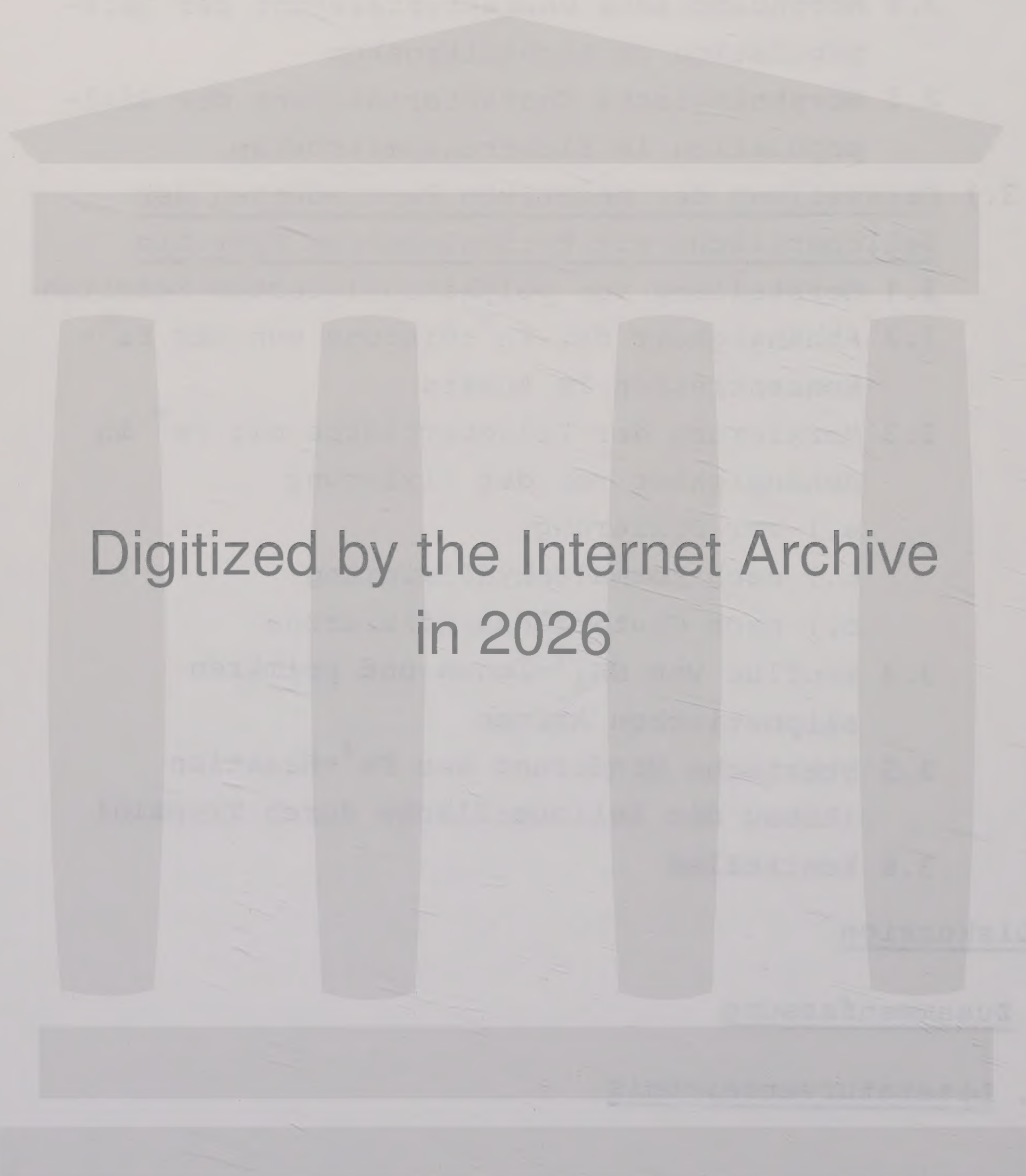
IV. Ergebnisse

1.) <u>Isolierung einer Mischpupulation von Lymphozyten und Monozyten</u>	22
2.) <u>Charakterisierung der Zellpopulation</u>	27
2.1 Bestimmung der Zellzahl und Beurteilung der Vitalität	27
2.2 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Lichtmikroskop	27
2.3 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Elektronenmikroskop	29
3.) <u>Darstellung der negativen Festladungen der Zelloberfläche mit kationisiertem Ferritin</u>	35
3.1 Herstellung von polykationisiertem Ferritin	35
3.2 Abhängigkeit der Fe^{+} -Bindung von der Fe^{+} -Konzentration im Ansatz	38
3.3 Markierung der Zelloberfläche mit Fe^{+} in Abhängigkeit von der Fixierung	45
a.) vor Fixierung	45
b.) nach Formaldehydfixierung	50
c.) nach Glutaraldehydfixierung	50
3.4 Einfluß von NH_4^{+} -Ionen und primären aliphatischen Aminen	58
3.5 Sterische Hinderung der Fe^{+} -Reaktion (Abbau der Zelloberfläche durch Trypsin)	61
3.6 Kontrollen	75

V. Diskussion

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Während der letzten 30 Jahre ist durch zahlreiche Untersuchungen die entscheidende Rolle der Zelloberfläche beim Ablauf biologischer Prozesse deutlich geworden. Zum Teil ist es gelungen, Komponenten, an denen sehr spezifische Reaktionen stattfinden, zu identifizieren und auch zu lokalisieren. Um charakteristische Beispiele zu nennen, sei hier auf Rezeptoren für Peptidhormone und Neurotransmitter (KAHN, 1976; BARRANTES, 1979) und auf Antigene (MANDEL et al, 1971) hingewiesen.

Zum Teil benutzt man jedoch pauschale Eigenschaften der Zelloberfläche, um biologische Prozesse verstehen zu lernen, und auch um normale und pathologische Zustände zu unterscheiden. Zu diesen Eigenschaften zählt der Ladungszustand der Zelloberfläche (WEISS, 1969; MEHRISHI, 1972).

Aus Untersuchungen mittels Elektrophorese ist bekannt, daß im physiologischen pH-Bereich die Nettoladung der Zelloberfläche negativ ist (MEHRISHI, 1972). Aus den Untersuchungen läßt sich außerdem auf verschiedene Typen von anionischen und basischen Gruppen schließen, deren pK-Werte bei 2,6 - 2,8, 3 - 4 und 9 liegen. Zu den bereits identifizierten negativ geladenen Gruppen, die den Hauptanteil stellen, zählen:

- a.) die α -Carboxylgruppen der N-Acetylneuraminsäure (PIPER, 1957; COOK et al, 1961; EYLAR et al, 1962; MADOFF et al, 1964; SEAMAN et al, 1966; VASSAR et al, 1966; THOMSON und MEHRISHI, 1969)
- b.) die Ribonuklease-empfindlichen Phosphatgruppen (MAYHEW und WEISS, 1968)
- c.) die alkalische Phosphatase-empfindlichen Phosphatgruppen (MEHRISHI, 1970)

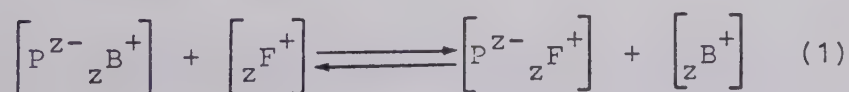
Diese überwiegen zahlenmäßig die positiv geladenen Gruppen, die sich in erster Linie aus den Seitenketten der basischen Aminosäuren sowie aus den Aminogruppen der Phospholipide und Glykolipide rekrutieren.

Veränderungen der Zelloberfläche - sei es, daß sie experimentell herbeigeführt worden sind, sei es, daß eine pathologische Ursache dafür vorgelegen hat - können einen Ausdruck in einer Veränderung des Ladungsmusters finden (z.B. GASIC et al, 1968; UHLENBRUCK et al, 1968; SKUTELSKY et al, 1975; FORRESTER et al, 1963; RUHENSTROTH-BAUER und FUHRMANN, 1961; BORYSENKO und WOODS, 1979). Auf diesem Hintergrund ist zu verstehen, daß morphologische Methoden gesucht werden, mit denen erstens die Anzahl der Ladungen auf der Zelloberfläche bestimmt werden kann und mit denen zweitens die Verteilung der Ladung dargestellt werden kann.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen werden neben positiv und negativ geladenen Kolloiden von Metalloxyden (MOWRY, 1958; CURRAN et al, 1966; GASIC et al, 1968) modifizierte Ferritine (NACHMIAS und MARSHALL, 1961; DANON et al, 1972) für die Markierung von positiv und negativ geladenen Gruppen eingesetzt. Die Mehrheit der morphologischen Arbeiten befaßt sich zur Zeit mit der Charakterisierung der negativen Ladungen der Zelloberfläche. Dazu wird bevorzugt kationisiertes Ferritin (Fe^+) verwendet.

Der Grund liegt darin, daß Fe^+ bei physiologischen pH-Werten noch ausreichend dissoziiert ist, um eine Salzbindung einzugehen, und daß zudem die Einzelteilchen elektronenmikroskopisch gut zählbar sind. Positiv geladene Kolloide von Metalloxyden sind dagegen erst bei einem pH-Wert unter 2 ausreichend dissoziiert und können somit nur nach Fixierung der Zellen eingesetzt werden. Sie reagieren dann nur mit anionischen Gruppen, deren pK-Wert unter 2 liegt.

Die bisherigen experimentellen Erfahrungen deuten darauf hin, daß Fe^+ eine salzartige Bindung eingeht. Die Reaktion kann im einfachsten Fall als Ionenaustausch beschrieben werden (SCOTT, 1970):



und

$$E = \frac{\begin{bmatrix} P^{Z-} & F^+ \\ & Z \end{bmatrix}}{\begin{bmatrix} P^{Z-} & B^+ \\ & Z \end{bmatrix}} = K \cdot \left[\frac{\begin{bmatrix} F^+ \end{bmatrix}}{\begin{bmatrix} B^+ \end{bmatrix}} \right]^Z \quad (2)$$

Daraus ergibt sich, daß die Anzahl der pro Flächeneinheit markierten Ladungen von der Konzentration der Reaktionspartner und deren Dissoziationsgrad sowie von den Gleichgewichtskonstanten abhängig ist. Dazu kommt, daß die Träger der anionischen Gruppen Makromoleküle sind (s.o.), die in oder auf der fluiden Plasmamembran als bewegliche Komponenten aufzufassen sind. Es ist daher anzunehmen, daß durch unterschiedliche experimentelle Randbedingungen unterschiedliche Markierungsmuster hinsichtlich Zahl und Ortsverteilung hervorgerufen werden können.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die am einflußreichsten erscheinenden Randbedingungen an Modellen zu studieren. Dies waren folgende variable Parameter:

- a.) der Einfluß der Fe^+ -Konzentration auf die Zahl und Verteilung der markierten anionischen Gruppen, sowie die Verdrängbarkeit von Fe^+ , dessen positive Ladung durch Einführung von NH_2 -Gruppen erzielt wurde, durch Ammoniumsalze und Amine; und
- b.) der Einfluß der Temperatur und der Fixierungsart auf das Verteilungsmuster der markierten anionischen Gruppen.

Als Modell wurden einerseits menschliche Blutzellen, andererseits die Oberfläche eines kugelförmigen Hochpolymeren verwendet. Der Einsatz von Zellen war Anlaß, bei allen Experimenten den pH-Wert konstant und die Salzkonzentration im Ansatz im isotonischen Bereich (280 mosmol/kg) zu halten.

Im Laufe der Fertigstellung dieser Arbeit sind Untersuchungen an einer Reihe von Zellsystemen erschienen, die den hier zusammengefaßten Gesichtspunkten in der einen oder anderen Richtung bereits Rechnung tragen. Sie werden in der Diskussion dargestellt und mit unseren Ergebnissen verglichen werden.

II. Materialien

1.) Chemikalien

Cacodylsäure

Serva Feinbiochemica

Na-Salz

Heidelberg

Epon 812^R

Serva Feinbiochemica

Heidelberg

Ferritin, 2x krist., reinst
10%-ige sterile wässrige Lö-
sung, Cd-frei aus Pferdemicz

Serva Feinbiochemica

Heidelberg

Glutaraldehyd (25%-ig)

Serva Feinbiochemica

Heidelberg

Gurr's Neutral Mounting

Deutsche Schwab Reagentien

Medium (n= 1,5104)

GmbH, Villmar-Aumenau

Liquemin^R Roche

Hoffmann-La Roche AG,

(5000 USP-E/ml Na-Heparinat)

Grenzach-Wyhlen

Lymphoprep^R

Nyegaard & Co., Oslo

Osmiumtetroxyd

Serva Feinbiochemica

Heidelberg

PercollTM

Pharmacia Fine Chemicals,

Uppsala

Rinderserumalbumin (BSA)

Serva Feinbiochemica

Cohn Fraktion V

Heidelberg

Testsimplets für Differential-
blutbilder

Boehringer, Mannheim

Toluidinblau O für die
Mikroskopie

Merck, Darmstadt

Typanblau, krist.

Deutsche Schwab Reagentien
GmbH, Villmar-Aumenau

Trypsin von Rinderpancreas,
ca. 40 U/mg, 2x krist.

Serva Feinbiochemica
Heidelberg

2.) Puffer

2.1. Isolierungspuffer: Hanks, isoton

Zusammensetzung:

CaCl ₂ +2 H ₂ O.....	1,26 x 10 ⁻³ mol/l	
MgSO ₄ +7 H ₂ O.....	0,81	"-
KCl.....	5,36	"-
KH ₂ PO ₄	0,44	"-
Na ₂ HPO ₄ +2 H ₂ O.....	0,34	"-
NaHCO ₃	4,17	"-
NaCl.....	136,89	"-
Glucose+H ₂ O.....	5,05	"-

Aqua bidest. ad 1000 ml, pH 7,4, Osmolalität:

280 mosmol/kg

Modifikationen:

2.1.a) Hanks/BSA: Hanks, isoton, mit einem Zusatz von 1% (v/w)

Rinderserumalbumin (pH 7,4, 280 mosmol/kg)

2.1.b) Hanks/BSA/Heparin: wie 2.1.a, mit einem Zusatz von

0,1% (v/v) Liquemin^R (pH 7,4, 280

mosmol/kg)

2.1.c) Hanks, hyperton: Hanks, isoton, mit einem Zusatz von
 0,054 mol NaCl/l (pH 7,4, 380
 mosmol/kg)

2.2 Inkubationspuffer: Medium 199^R, Fa. Seromed

Zusammensetzung:

DL-Alanin.....50	Natriumacetat.....50
L-Arginin HCl.....70	Fe(NO ₃) ₃ 0,1
DL-Asparaginsäure.....60	Tween 80 ^R20
L-Cystein HCl..... 0,1	
L-Cystin.....20	Adeninsulfat.....10
L-Glutamin.....100	Guanin HCl..... 0,3
DL-Glutaminsäure H ₂ O.150	Hypoxanthin..... 0,3
Glycin.....50	Thymin..... 0,3
L-Histidin HCl.....20	Uracil..... 0,3
L-Hydroxyprolin.....10	Xanthin..... 0,3
DL-Isoleucin.....40	ATP,Na ₂ 1
DL-Leucin.....120	AMP..... 0,2
L-Lysin HCl.....70	
DL-Methionin.....30	Ascorbinsäure..... 0,05
DL-Phenylalanin.....50	Biotin..... 0,01
L-Prolin.....40	Calciferol..... 0,1
DL-Serin.....50	D-Ca-Pantothenat..... 0,01
DL-Threonin.....60	Cholinchlorid..... 0,5
DL-Tryptophan.....20	Folsäure..... 0,01
DL-Valin.....50	i-Inosit..... 0,05
Glutathion..... 0,05	Menadion..... 0,01

Nicotinsäure.....	0,025	DL- α -Tocopherol-	
Nicotinamid.....	0,025	phosphat, Na ₂	0,01
p-Aminobenzoesäure...	0,05	Vitamin A.....	0,1
Pyridoxal HCl.....	0,025	Cholesterin.....	0,2
Pyridoxin HCl.....	0,025	2-Desoxy-D-Ribose....	0,5
Riboflavin.....	0,01	D-Ribose.....	0,5
Thiamin HCl.....	0,01		

3.) Gradientenmedien:

3.1. Lymphoprep^R- Gradient

Der Lymphoprep^R- Gradient bestand aus 2 Dichtestufen:

1.Stufe: (Dichte 1,077 g/ml) Lymphoprep^R (7 ml)

2.Stufe: (Dichte 1,056 g/ml) 2 VT Lymphoprep^R wurden mit
1 VT isotonem Hanks-Medium gemischt (10 ml)

3.2. PercollTM- Gradient

Ausgangslösung: 9 VT PercollTM

= L I 1 VT Natriumchloridlösung 1,2 mol/l

Die Ausgangslösung wurde auf pH 7,4 eingestellt, Osmo-
lalität 280 mosmol/kg, Dichte 1,125 g/ml.

Davon ausgehend wurden durch Verdünnung mit Hanks-Puffer
(pH 7,4, 280 mosmol/kg) PercollTM-Lösungen folgender
Dichte hergestellt:

L I	1,125 g/ml	n= 1,3520
55,5 VT L I +44,5 VT Hanks	1,107 g/ml	n= 1,3440
46 VT L I +54 VT Hanks	1,106 g/ml	n= 1,3425
30 VT L I +70 VT Hanks	1,104 g/ml	n= 1,3400

Die Gradienten wurden bei Raumtemperatur in Zentrifugenröhrchen aus Zellulose Nitrat mit 30 ml Nenninhalt durch Unterschichten hergestellt. Alle Gradientenlösungen waren isoosmotisch und auf einen pH von 7,4 eingestellt. Für die Bestimmung der Dichte der PercollTM-Verdünnungen über den Refraktionsindex wurden die in der Produktinformation angegebenen Kurven verwendet. Zur Bestimmung der Dichte von Lymphoprep^R-Verdünnungen wurde eine Eichkurve angefertigt (Abbildung 1).

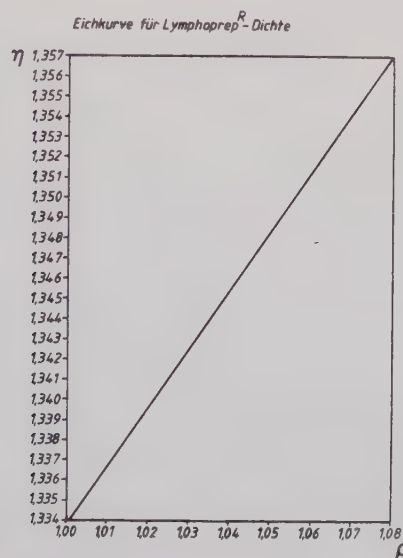


Abbildung 1.: Eichkurve für Lymphoprep^R-Dichte

Die Meßflüssigkeiten wurden vor dem Einfüllen in das Pyknometer 1 Stunde im Wasserbad bei 20^o C äquilibriert. Das Pyknometer wurde 15 min äquilibriert. Die Verdünnungen wurden mit Hanks-Puffer (pH 7,4, 280 mosmol/kg) hergestellt.

4.) Weitere Medien:

- 4.1. Glutaraldehyd wurde als 2,5%-ige Lösung in isot. Caco-dylatpuffer (0,143 mol/l) verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt, die Osmolalität betrug 530 mosmol/kg.
- 4.2. Osmiumtetroxyd wurde als 2%-ige Lösung in isot. Caco-dylatpuffer (0,143 mol/l) verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt, die Osmolalität betrug 330 - 350 mosmol/kg.

III. Methoden

1. Isolierung einer Mischpopulation von Lymphozyten und Monozyten.

Heparinisiertes Venenblut eines gesunden, nüchternen männlichen Spenders der Blutgruppe A₁ rh pos. wurde innerhalb von etwa 1 1/2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) nach dem bereits 1968 von BØYUM beschriebenen und 1974 und 1976 modifizierten Trennprinzip in folgender Weise aufgearbeitet:

100 ml Vollblut wurden mit hypertonem Hanks-Medium von 380 mosmol/kg im Verhältnis 1:2 (v/v) verdünnt, so daß sich für die Blut-Puffer-Mischung eine endgültige Osmolalität von 330 mosmol/kg ergab. In 4 Zentrifugengläsern mit 100 ml Inhalt wurden mit Scheidetrichtern 50 ml der Blut-Hanks-Mischung auf 30 ml Lymphoprep^R überschichtet und 30 min bei 400 x g an der Grenzschicht Serum/Lymphoprep^R zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert. Die an der Grenzschicht Serum/Lymphoprep^R ausgebildete Bande aus Leukozyten und Thrombozyten wurde in einen Meßkolben mit einer Vorlage von ca. 10 ml Hanks/Hep/BSA übertragen und auf das Verhältnis 1:2 (v/v) mit Hanks/Hep/BSA verdünnt.

Die verdünnte Zellsuspension wurde nach Aufteilung auf 2

Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen 5 min bei 900 x g am Röhrchenboden sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet sorgfältig in 6-12 ml Hanks/Hep/BSA resuspendiert (Sediment I). Diskontinuierliche Gradienten aus PercollTM (PC) oder Lymphoprep^R (LP) (siehe Seite 9) wurden mit je 3 ml dieser Zellsuspension überschichtet und 5 min (PC) bzw. 8 min (LP) bei 400 x g an der Phasengrenze der Dichtestufen 1,06 g/ml und 1,07 g/ml zentrifugiert. Die Fraktionen, die die Leukozyten enthielten, wurden nach Austropfen in Hanks/BSA 5 min bei 900 x g am Röhrchenboden zentrifugiert. Das Pellet wurde sorgfältig in ca. 10 ml Hanks/BSA suspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 900 x g am Röhrchenboden zentrifugiert. Das Pellet wurde im jeweiligen Inkubationsmedium aufgenommen (Sediment II).

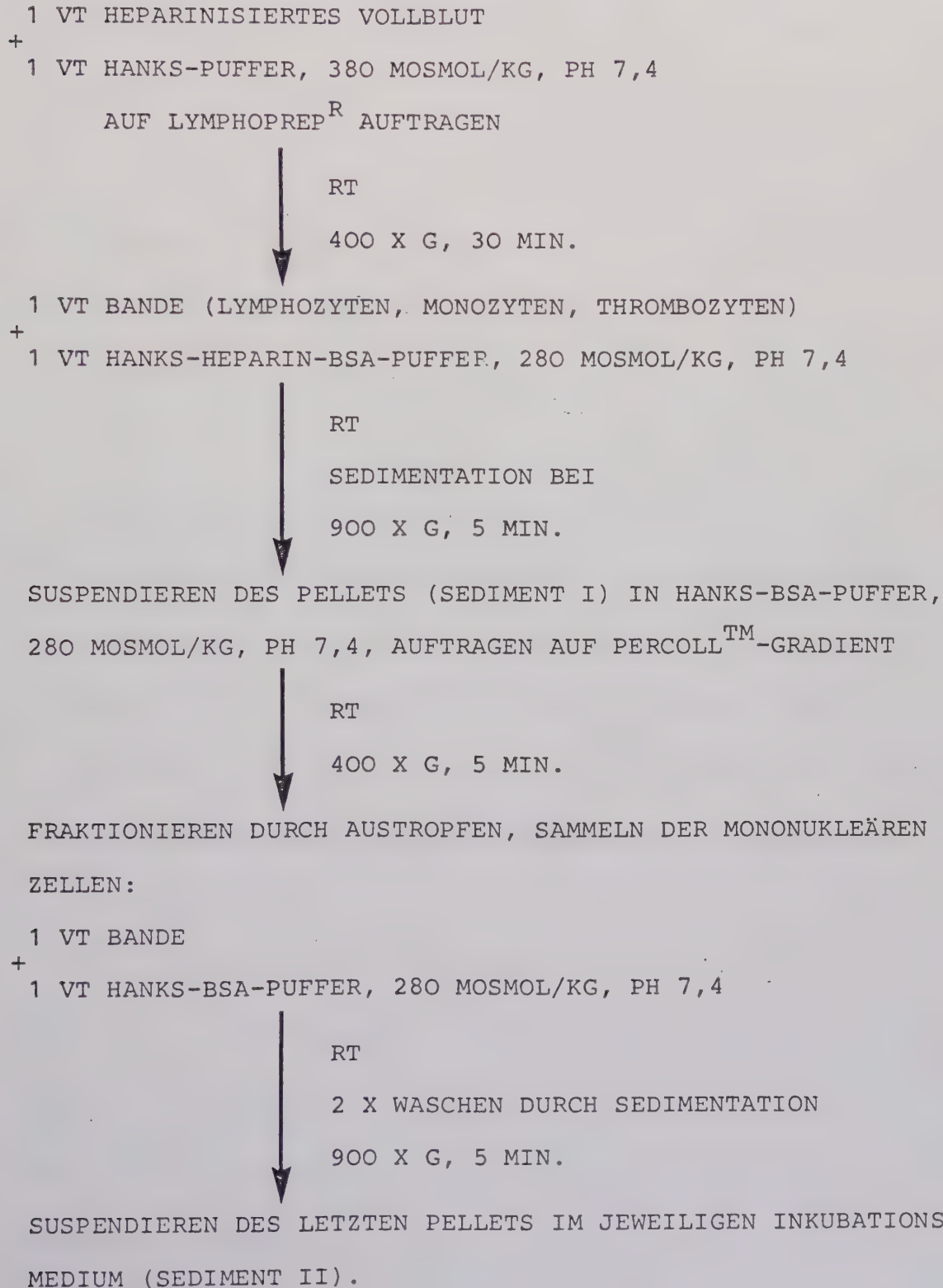
Die einzelnen Präparationsschritte sind übersichtshalber in einem Schema zusammengefaßt (Abb. 2).

2. Charakterisierung der Zellpopulation

2.1. Bestimmung der Zellzahl und Beurteilung der Vitalität.

Die Zellzahl wurde im Interferenzkontrast in der Neubauer-Kammer bei ca. 250-facher Vergrößerung bestimmt.

Abbildung 2.:

ANREICHERUNG VON LYMPHOZYTEN UND MONOZYTENAUS MENSCHLICHEM HEPARINISIERTEN BLUT

Die Vitalität der Zellen wurde durch den Trypanblau-Exklusionstest bestimmt (TENNANT, 1965).

2.2. Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Lichtmikroskop.

Zur Differenzierung der Zelltypen wurde in erster Linie die unfixierte Zellpopulation herangezogen.

- a.) Größe, Form und Fähigkeit der Zellen, auf Glasoberflächen zu spreiten, wurden im Interferenzkontrast in der ungefärbten Zellsuspension beurteilt.
- b.) Eosinophile und basophile Granulozyten zur Identifizierung der Granulozyten wurden mit der panoptischen Färbung nach PAPPENHEIM im Ausstrichpräparat mit Öl-Immersion im Durchlicht beurteilt. Zum Teil wurden für Ausstrichpräparate auch "Testsimplets" (Fa. Merck) verwendet.

Die fixierte Zellpopulation wurde in Epon 812 eingebettet (siehe 2.3.). Semidünnschnitte (0,5-1 μ m) wurden mit Toluidinblau gefärbt. Diese Schnitte wurden hauptsächlich als Orientierungshilfe für elektronenmikroskopische Schnittpreparate verwendet.

2.3 Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation in Elektronenmikroskop.

1 VT der Zellsuspension wurde mit 1 VT 2,5% (v/v) Glutaraldehyd (GA) in 0,143 M Kakodylat-Puffer (Fixierungslösung: 550 mosmol/kg, pH 7,4) 10 min fixiert, 2 x in 0,143 M Kakodylat-Puffer (280 mosmol/kg, pH 7,4) gewaschen und 1 Stunde mit 2% (w/v) OsO_4 in 0,143 M Kakodylat-Puffer (Fixierungslösung: 360 mosmol/kg, pH 7,4) nachfixiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x in 0,143 M Kakodylat-Puffer gewaschen. Die fixierten Zellen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Epon 812 eingebettet.

Von den eingebetteten Zellen wurden Ultradünnschnitte von 600-900 Å Dicke, entsprechend der Interferenzfarbe Silber (PEACHEY, 1958, BACHMANN und SITTE, 1958), angefertigt. Die Kontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte nach REYNOLDS (1963) oder nach VENABLE und COGGESHALL (1965). Ein Teil der Schnitte wurde unkontrastiert verwendet. Die Schnitte wurden in einem Elmiskop 102 untersucht.

Zur Identifizierung der Monozyten wurde deren Fähigkeit, Latexpartikel zu phagozytieren, herangezogen. $20-30 \times 10^6$ frisch isolierte Leukozyten pro ml wurden mit Polystyrol-Latex (Durchmesser 0,1-0,5 μm) 1 Stunde bei RT inkubiert.

Die überschüssigen Latexpartikel wurden über einen zweistufigen Gradienten (LP) (Dichte 1,05 g/ml und 1,077 g/ml) durch Zentrifugation, 5 - 10 min bei 400 x g, abgetrennt. Die Zellen wurden danach wie oben beschrieben fixiert und eingebettet.

3. Darstellung der negativen Festladungen der Zelloberfläche mit kationisiertem Ferritin (Fe^+). *)

3.1. Herstellung von polykationisiertem Ferritin.

Ferritin wurde nach der Methode von DANON et al (1972) mit N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methyl morpholino)-ethyl]-carbodiimid-p-toluolsulfonat aktiviert und bei pH 5 oder pH 6,5 mit Hexamethyldiamin umgesetzt. Ein Teil des umgesetzten Ferritins wurde gegen isotone Kochsalzlösung dialysiert. Ein Teil wurde über eine mit 0,1 n Kochsalzlösung äquilibrierte Sepharose 6B Säule chromatographiert und anschließend gegen isotone Kochsalzlösung dialysiert.

*) Die Präparation des Fe^+ wurde freundlicherweise von Dr. L. Herbertz durchgeführt.

3.2. Abhängigkeit der Fe^+ -Bindung von der Fe^+ -Konzentration im Ansatz.

Als Testobjekt wurden Polystyrol-Latexpartikel mit einem mittleren Durchmesser von $1,1 \mu\text{m}$ und einer Dichte von $1,05 \text{ g/ml}$ verwendet. Die Partikelkonzentration wurde so gewählt, daß die exponierte Gesamtoberfläche größenordnungsmäßig derjenigen bei Zellversuchen vergleichbar war. Sie betrug ca. $6,5 \times 10^9$ Latexpartikel pro ml.

Je 1 ml Partikelsuspension wurde mit je 1 ml Fe^+ bei RT 60 min inkubiert. Die höchste Fe^+ -Konzentration im Ansatz betrug $0,3 \text{ mg/ml}$. Die weiteren Verdünnungsstufen waren 1:5, 1:10, 1:20 und 1:100. Nach 60 min wurde das ungebundene Fe^+ durch Zentrifugation abgetrennt, das Sediment in 1 ml Wasser aufgenommen und mit 1 ml 2,5% GA-Lösung mehrere Stunden bei RT fixiert. Die Latexpartikel wurden danach 2 x in Wasser gewaschen und auf frisch gespaltene Glimmerflächen ausgestrichen. Von den Ausstrichpräparaten wurden Kohleabdrücke hergestellt. Der Fe^+ Besatz der Latexpartikel wurde an elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei einer Endvergrößerung von 100 000:1 ausgezählt.

3.3. Markierung der Zelloberfläche mit Fe^+ in Abhängigkeit von der Fixierung.

Die Lymphozyten/Monozyten Population (LY/MO) wurde in Medium 199 (M 199) suspendiert. Die Zellkonzentration betrug $10\text{--}20 \times 10^6$ Zellen pro ml. Die Zellsuspension wurde

a.) vor Fixierung

b.) nach Formaldehydfixierung

c.) nach Glutaraldehydfixierung

mit Fe^+ inkubiert.

a.) Je 2 ml der Zellsuspension wurden bei 4°C , RT und

37°C äquilibriert. Zu diesen Suspensionen wurden in der

Regel jeweils 0,5 ml einer Lösung von 0,3 - 0,5 mg Fe^+ pro ml in isotoner Kochsalzlösung, pH 7,4, hinzugefügt.

Abweichungen von dieser Fe^+ Konzentration sind bei den

Ergebnissen gesondert vermerkt. Die Fe^+ Lösungen waren

ebenfalls auf 4°C , respektive RT bzw. 37°C äquili-

briert. Nach 2 min wurden die Zellen 5 min bei $900 \times g$

sedimentiert, 1 x in 5 ml M 199 gewaschen und zuletzt

wieder in 2 ml M 199 suspendiert. Diese Zellsuspension

wurde in üblicher Weise fixiert (siehe 2.3.).

b.) Zur Vorfixierung wurden 2 ml der Zellsuspension für

10 min bei RT mit 200 μl ca. 10% igem Formaldehyd (FA),

entsprechend einer Endkonzentration im Ansatz von ca. 3×10^{-1} mol/l inkubiert und anschließend 2 x in M 199 gewaschen. Die Markierung mit Fe^+ erfolgte wie unter a.) beschrieben.

c.) Zur Glutaraldehydvorfixierung wurden 2 ml der Zellsuspension für 10 min bei RT mit 200 μ l 2,5% igem (v/v) GA, entsprechend einer Endkonzentration im Ansatz von ca. 2×10^{-2} mol/l inkubiert und anschließend 2 x in M 199 gewaschen. Die Markierung mit Fe^+ erfolgte wie unter a.) beschrieben.

Nach Vorfixierung mit Aldehyden wurde vor der Markierung der Zellen mit Fe^+ in einem Aliquot der Zellsuspension mit fuchsin-schwefliger Säure auf freie Aldehydgruppen geprüft.

3.4. Einfluß von NH_4^+ - Ionen und primären aliphatischen Aminen.

Ein Teil der unfixierten oder mit GA vorfixierten Zellen wurde mit 0,9% igem Ammoniumchlorid in 0,9% iger NaCl-Lösung, entsprechend einer Endkonzentration im Ansatz von ca. 2×10^{-1} mol/l entweder nach der Isolierung oder unmittelbar nach der GA-Vorfixierung für 10 min inkubiert. Anschlie-

end wurde entweder sofort oder nach zweimaligem Waschen in üblicher Weise mit Fe^+ markiert.

Entsprechende orientierende Versuche wurden mit Methylamin in 0,9% iger NaCl-Lösung, entsprechend einer Endkonzentration im Ansatz von ca. 5×10^{-1} mol/l durchgeführt.

3.5. Abbau der Zelloberfläche durch enzymatische Behandlung.

2 ml der Zellsuspension wurden mit Trypsin (Trypsinkonzentration 20 U/ml) bei 37°C unter langsamem Rotieren 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion in Eis gestoppt. Die Zellen wurden mit eiskaltem M 199 2 x gewaschen und entweder unfixiert oder nach GA-Vorfixierung mit Fe^+ markiert.

3.6. Kontrollen.

Die unterschiedlich vorbehandelten Zellen wurden jeweils mit nativem Ferritin in gleicher Konzentration in Parallelansätzen inkubiert.

IV. Ergebnisse

1. Isolierung einer Mischpopulation von Lymphozyten und Monozyten.

Es wurde die Isolierung einer Mischpopulation von Lymphozyten und Monozyten mit möglichst geringer Verunreinigung durch andere Zelltypen angestrebt. Ausbeute und Reinheit waren von verschiedenen Isolierungsbedingungen abhängig.

Naturgemäß ist die Spenderpopulation nicht homogen. Bei der Auswahl der Spender wurde darauf geachtet, zumindest die leicht kontrollierbaren Parameter konstant zu halten. Es wurde nur Blut von männlichen Spendern verwendet, um eventuelle zyklusabhängige Blutveränderungen zu vermeiden.

Außerdem wurden folgende Bedingungen eingehalten: gleiche Blutgruppe (A, rh pos.), keine Infektionen, keine Medikamente, nüchtern bei Blutentnahme. In lipämischen Seren bandeten z.B. LY/MO schlechter, was deutlich verringerte Ausbeuten zur Folge hatte.

Die Defibrinierung des Blutes mit Glasperlen erwies sich für die Isolierung von LY/MO als ungünstig. Erstens ließ sich die Hämolyse eines Teils der Erythrozyten nicht vermeiden.

Zweitens verfringen sich in den Thrombozytenaggregaten zahlreiche Zellen. Die Ausbeuten an LY/MO waren unbefriedigend.

Gute Ergebnisse wurden mit heparinisierten Blutkonserven erzielt, wobei es sich empfiehlt, während der gesamten Entnahmezeit zur Vermeidung von Koagelbildung das Blut sorgfältig zu mischen.

Bei der Verdünnung des Vollblutes um mehr als 1:2 (v/v) oder bei Verwendung eines "buffy coat" war die Erythrozytenzahl pro Volumeneinheit zu gering, um eine vollständige Verklumpung während der Lymphoprep^R Passage zu gewährleisten (eigene Beobachtung und BØYUM, 1968 und 1974). Hieraus resultierte eine hohe Kontamination mit Erythrozyten.

Während die Abtrennung der Granulozyten bereits nach dem ersten Zentrifugationsschritt erfolgreich war (Kontamination unter 1%), war die Abtrennung der Thrombozyten bei Verwendung von heparinisiertem Blut noch nicht ausreichend. Das Verhältnis von Thrombozyten zu kernhaltigen Zellen war etwa 1:10. Es war ein weiterer Zentrifugationsschritt erforderlich. Um bei der weiteren Aufarbeitung die Bildung von Gerinnseln zu verhindern, mußte zu dem Puffermedium Heparin zugesetzt werden.

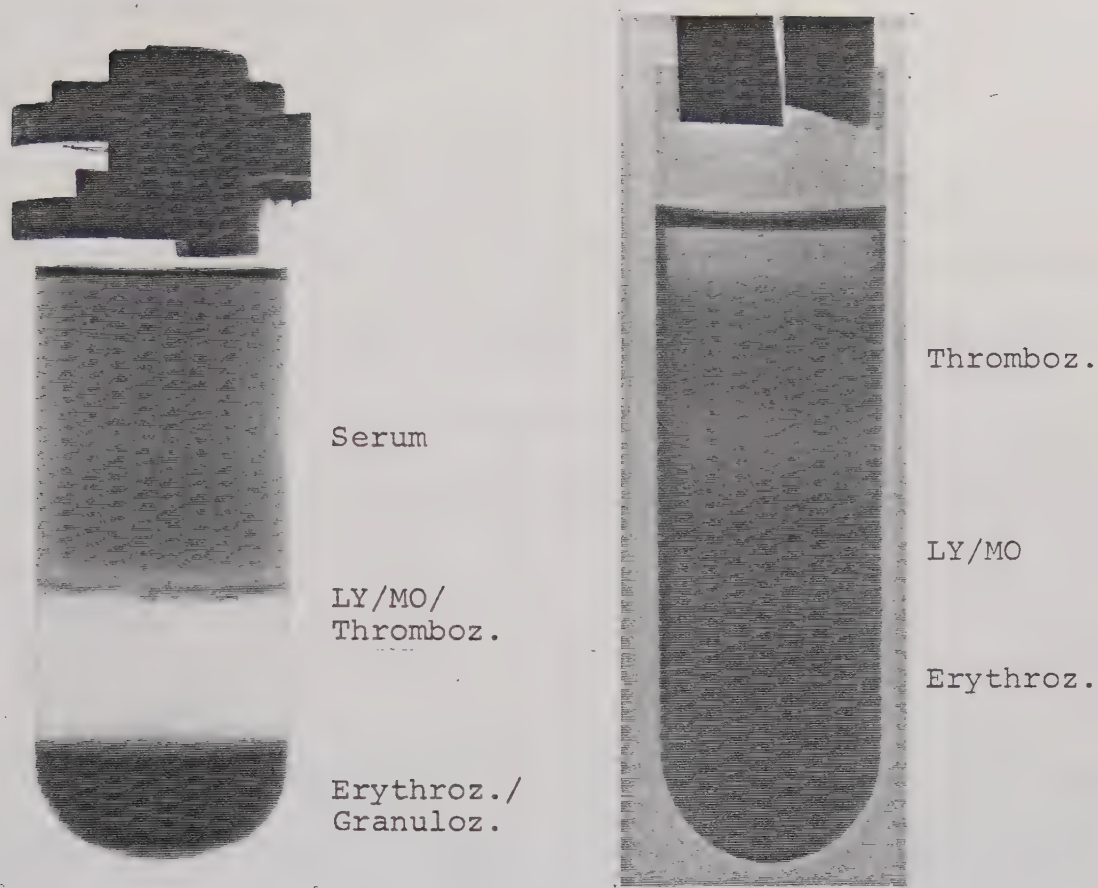


Abbildung 3.: Gradienten nach Zentrifugation

- a. Lymphoprep^R-Gradient mit 2 Dichtestufen
(= 1,077 bzw. 1,056 g/ml)
- b. PercollTM-Gradient mit 4 Dichtestufen
(= 1,125, 1,07, 1,06 und 1,04 g/ml)

Eine weitgehende Abtrennung der Thrombozyten gelang mit einem zweiten Gradienten (Abb. 3). Bei Verwendung von PercollTM bandeten die Thrombozyten diffus zwischen den PercollTM-Stufen der Dichte 1,04 g/ml und 1,06 g/ml, während LY/MO an der Phasengrenze der Dichtestufen 1,06 g/ml und 1,07 g/ml eine scharfe Bande formten. Erythrozyten und einige kleine Lympho-

zyten bandeten auf der Gradientenstufe mit der Dichte 1,125 g/ml.

Insgesamt resultierte aus dem zweiten Reinigungsschritt eine weitere Reduktion des Erythrozytenanteils und eine erhebliche Verminderung der Thrombozytenzahl. Die verbliebene Verunreinigung von Thrombozyten/kernhaltigen Zellen war hauptsächlich durch die den Monozyten anhaftenden Thrombozyten bedingt (siehe auch Abb. 4).

Die geringste Kontamination mit Erythrozyten, unter 1%, konnte erzielt werden, wenn zu Beginn der Reinigung die Osmolalität des Serums leicht erhöht wurde. In hypertonem Medium schrumpften die osmotisch sensibleren Erythrozyten (BØYUM, 1968).

Durch die resultierende Dichtezunahme wurde eine bessere Sedimentation erreicht. Da Lymphozyten osmotisch sensibler sind als Monozyten (BØYUM, 1968), ergab sich eine geringfügig geringere Ausbeute zugunsten eines relativen Anstiegs der Monozyten.

Die erzielbaren Ausbeuten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Der diskontinuierliche Lymphoprep^R-Gradient mit 2 Dichtestufen lieferte bezüglich Reinheit und Ausbeute etwa die

Tabelle 1

Isolierung von Lymphozyten und Monozyten

(n = 15)

	Zellzahl ($\times 10^6$)	Ausbeute (%)
	$\bar{X}$	
Leukozyten pro		
100 ml Vollblut	645 ± 140	100
Sediment I		
(Lymphoprep ^R)	212 ± 72	33
Sediment II		
(Percoll TM)	140 ± 66	22

Der Berechnung wurden Mittelwerte aus 15 Versuchen zugrunde gelegt. Die Ausbeute wurde in Bezug auf die Gesamt-Leukozytenzahl berechnet. Bezieht man auf den aktuellen Gehalt an Lymphozyten und Monozyten, so verbessert sich die Ausbeute im Mittel um den Faktor 2.

gleichen Ergebnisse wie der PercollTM-Gradient. Da jedoch Lymphoprep^R mit einem Anteil von 9,6% (v/v) Metrizoate eine deutliche Unterdrückung von β - und γ -Strahlung, das sogenannte "quenching", bewirkt, ist sein Einsatz bei nachfolgenden biochemischen Analyseverfahren mit Radioisotopen wie z.B.

^{125}J ungünstig. In unserem Labor wurde deshalb der PercollTM-Gradient bevorzugt.

2. Charakterisierung der Zellpopulation

2.1. Bestimmung der Zellzahl und Beurteilung der Vitalität

Die Ausbeuten an LY/MO sind wie bereits erwähnt in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Der Vitalitätstest mit Trypanblau ergab in der Regel eine Ausschlußquote von über 99%. Die Anfärbbarkeit mit Trypanblau stieg während 24 Stunden bei 4° C nicht über 5% an.

2.2. Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Lichtmikroskop

In der Abbildung 4 ist die Zellpopulation, wie sie üblicherweise erhalten wurde, in einer Interferenzkontrast-Aufnahme dargestellt. Monozyten (Pfeile) unterscheiden sich von Lymphozyten durch ihre Fähigkeit, auf der Glasoberfläche des Objektträgers zu spreiten. An ihnen haften häufig Thrombozyten. Thrombozyten und Erythrozyten waren durch ihre Größe und Form gut erkennbar.

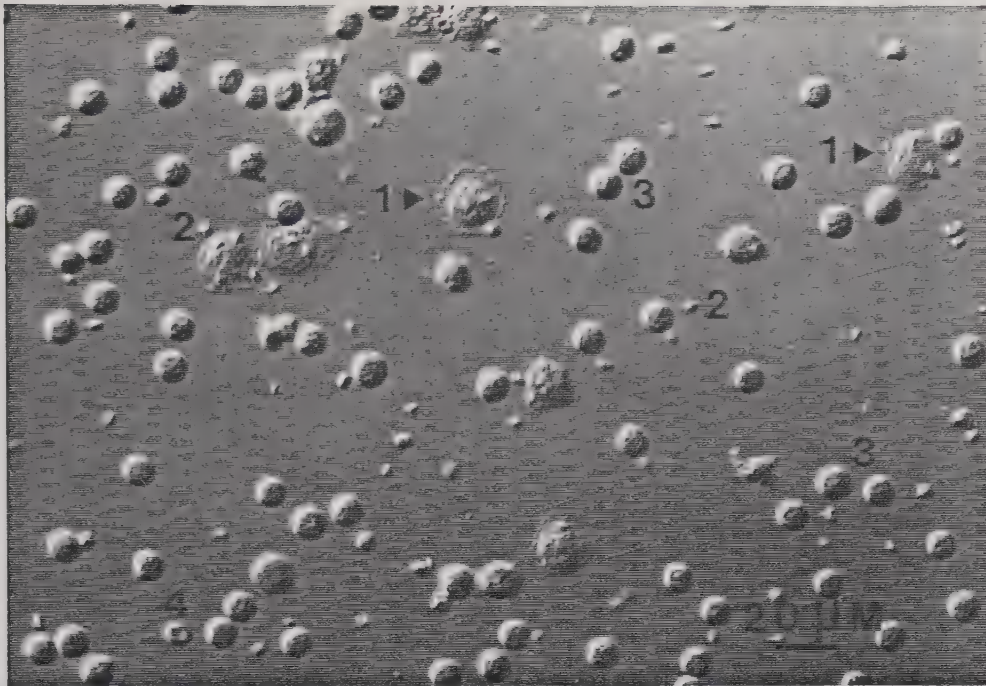


Abbildung 4.: Interferenzkontrast-Aufnahme einer frisch isolierten Zellpopulation

1. Monozyten (Pfeile), 2. Thrombozyt,
3. Lymphozyten, 4. Erythrozyt

Im Durchschnitt bestand die gereinigte Population der mononukleären Zellen aus 80-90% Lymphozyten und 10-20% Monozyten. Die Verunreinigung mit Erythrozyten und Granulozyten war unter 1%. Das Verhältnis von kernhaltigen Zellen/Thrombozyten betrug etwa 1:1,5.

2.3. Morphologische Charakterisierung der Zellpopulation im Elektronenmikroskop

Da Lymphozyten sich größtenteils in Stadien der Differenzierung, Proliferation oder Teilung befinden, ist die klassische Einteilung in kleine, mittelgroße und große Lymphozyten eine willkürliche, die einzelne Formen herausgreift. Dazwischen finden sich Übergangsformen.

Abbildung 5 zeigt ein Areal von kleinen und mittelgroßen Lymphozyten aus einer frisch isolierten Zellpopulation. Die Lymphozyten sind bei der Fixierung unmittelbar nach der Isolierung rund, mit wenigen kurzen Microvilli. Bei längerer Inkubationszeit und höherer Inkubationstemperatur bilden sie zahlreiche Microvilli und Zellfortsätze aus.

Kleine Lymphozyten: (Abbildung 6)

Im Schnittpräparat ist ihr Durchmesser unter $6\,\mu\text{m}$. Der Kern füllt den größten Teil des Zellvolumens aus. Es wird eine schmale Zytoplasmazone beobachtet. Auffallend sind zahlreiche freie Monoribosomen. Die Golgizone ist schmal. Es sind nur wenige Mitochondrien und wenige Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums vorhanden.

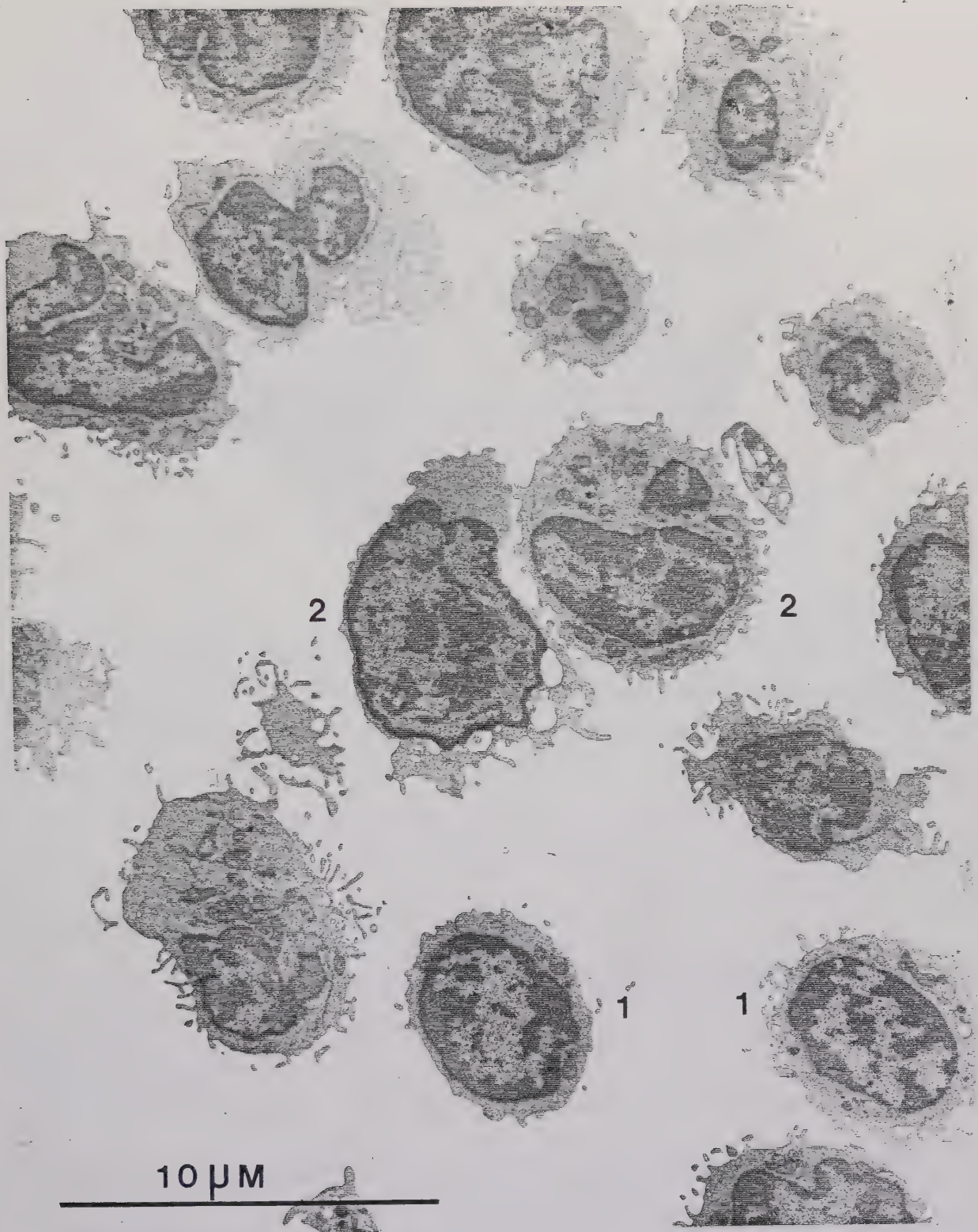


Abbildung 5.: frisch isolierte Zellpopulation mit
1. kleinen und 2. mittelgroßen
Lymphozyten

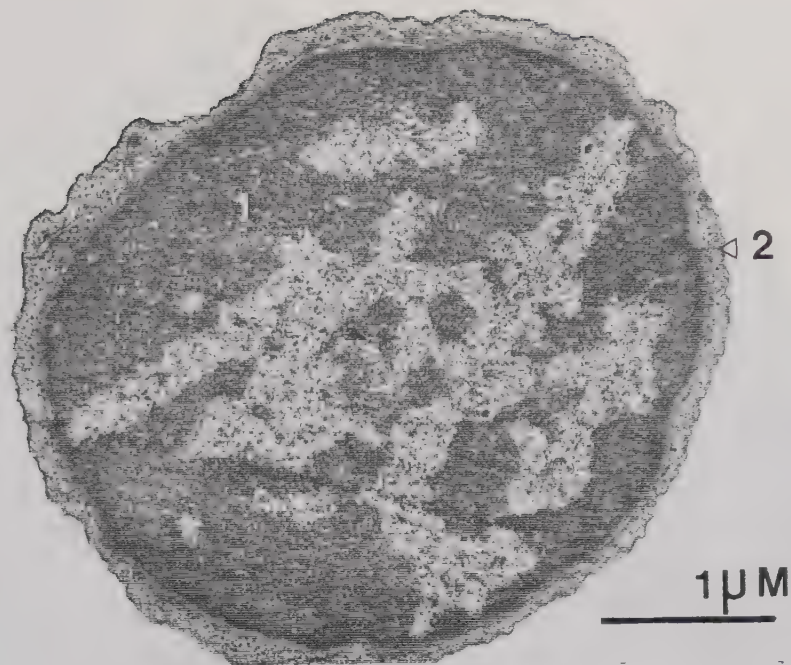


Abbildung 6.: Kleiner Lymphozyt

1. Zellkern, 2. schmaler Zytoplasmasaum
mit freien Ribosomen und Zisternen des
rER

Mittelgroße Lymphozyten : (Abbildung 7)

Zu ihnen zählen Zellen mit einem Durchmesser von 6-10 μm .

Der Kern ist groß und weist Einbuchtungen auf. Es werden zahlreiche freie Mono-, aber auch Polyribosomen beobachtet. Mitochondrien und Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulus sind in größerer Zahl vorhanden als bei kleinen Lymphozyten. Die Golgizone ist nicht besonders ausgeprägt. Microtubuli und Microfilamente werden beobachtet.

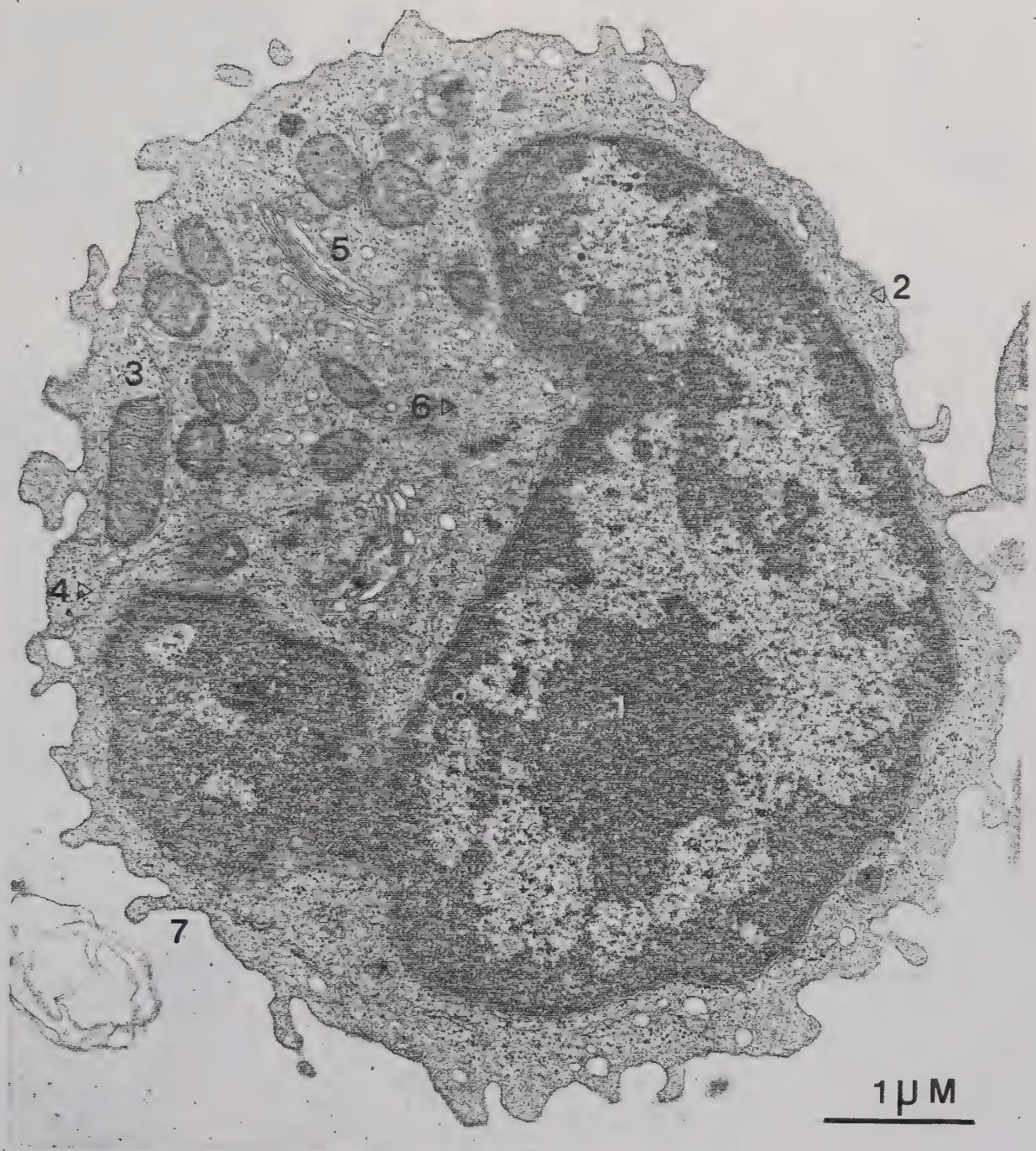


Abbildung 7.: Mittelgroßer Lymphozyt

1. Kern, 2. Mono- und Polyribosomen,
3. Mitochondrium, 4. Zisterne des rER,
5. Golgi-Apparat, 6. Microtubuli, 7. kurze Microvilli

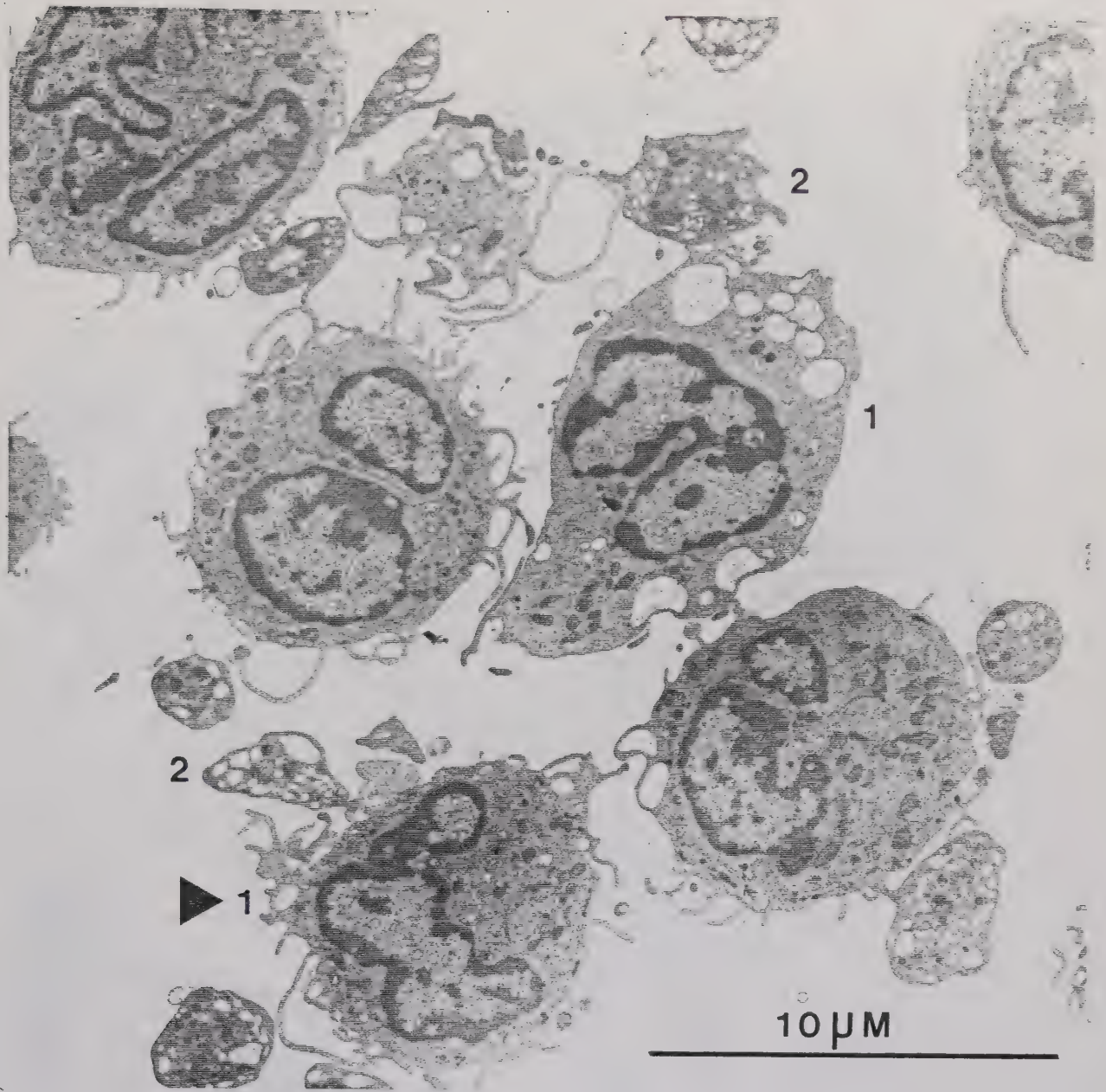


Abbildung 8.: Monozyten-Thrombozytenaggregate
1. Monozyten, 2. Thrombozyten

Monozyten werden häufig in kleineren Anhäufungen, inmitten von Lymphozytenarealen beobachtet. Wie bereits im lichtmikroskopischen Präparat beschrieben wurde (siehe Abb. 4), finden sich häufig Thrombozyten an Monozyten anhaftend, was



Abbildung 9.: Großer Monozyt, Ausschnitt von Abb. 8 (Pfeil)

- 1. nierenförmiger Kern, 2. Mitochondrium,
- 3. kurze Zisterne des rER, 4. Golgi-Apparat,
- 5. Zentriol, 6. Vakuolen und Vesikel,
- 7. lange Microvilli, 8. submembranöse Vakuole,
- 9. anhaftender Thrombozyt

zu Monozyten-Thrombozytenaggregaten führt (Abbildung 8).

Große Monozyten (Abbildung 9) besitzen einen nieren- bzw. hufeisenförmigen Kern, der exentrisch gelegen ist. Im Zytoplasma finden sich relativ wenige freie Ribosomen, zahlreiche kurze Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien und ein prominenter Golgi-Apparat, in dessen unmittelbarer Nachbarschaft das Paar Zentriolen, Vakuolen und Vesikel liegen. Sie besitzen zahlreiche kürzere und vor allem längere Microvilli und submembranöse Vakuolen. Zuordnungsprobleme aufgrund der Morphologie entstehen lediglich zwischen größeren Lymphozyten und kleineren Monozyten. Monozyten können jedoch eindeutig durch ihre Phagozytoseleistung identifiziert werden (Abbildung 10, a - c).

3. Darstellung der negativen Festladungen der Zelloberfläche mit kationisiertem Ferritin

3.1. Herstellung von polykationisiertem Ferritin

Nach Umsetzen des Ferritins mit Hexamethyldiamin und nach Dialyse gegen isotone Kochsalzlösung wurden zahlreiche Ferritinaggregate beobachtet. Wenn dagegen das umgesetzte Ferritin über eine Sepharose 6-B Säule chromatographiert wurde, lag

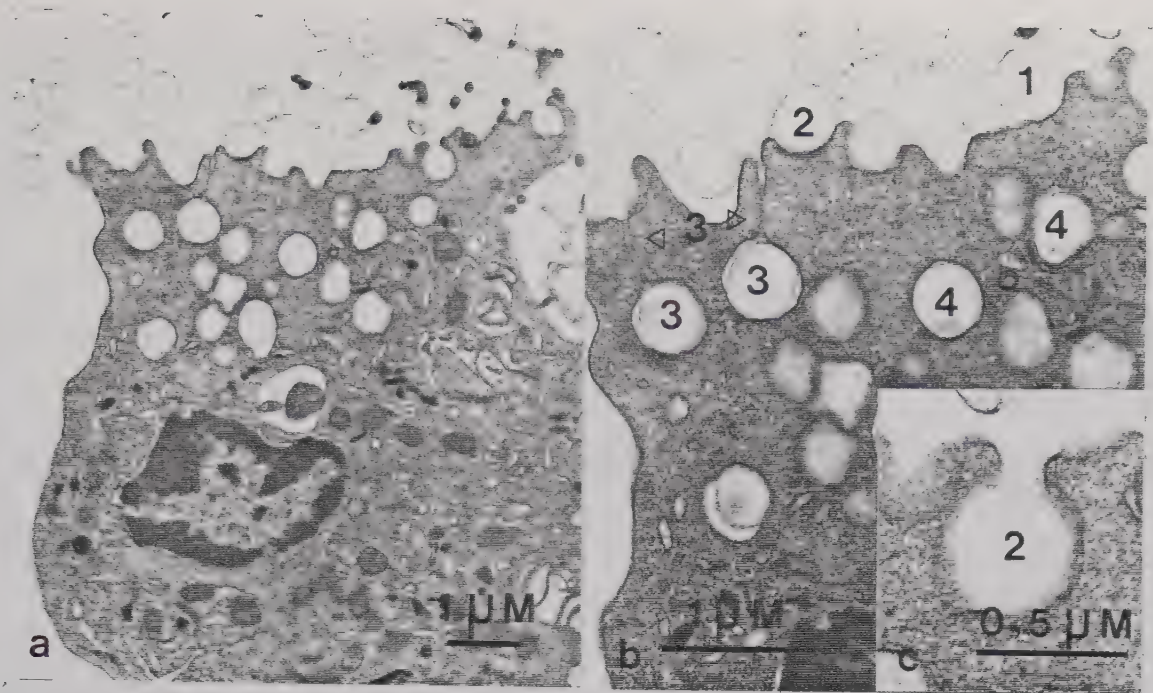


Abbildung 10.: a.) Latexphagozytose bei einem Monozyten, Übersicht

b. und c.) (Ausschnitte von a.)

Stadien der Phagozytose

1. Adsorption der Latexkugeln an die Zelloberfläche, 2. Zellausläufer beginnen die Latexkugeln zu umschließen, 3. Latexkugeln sind vollständig umschlossen, die Plasmamembranabschnitte aber noch nicht verschwunden, 4. vollständig inkorporierte Latexkugeln

Fe^+ zu etwa 70% in monomerer Form vor; etwa 20% des Fe^+ lag in Form von Dimeren vor, der Rest in Form von Tri- oder Oligomeren. Diese Zusammensetzung wurde aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt.

Abbildung 11 zeigt die Verteilung der an einem Formvar-Kohle-

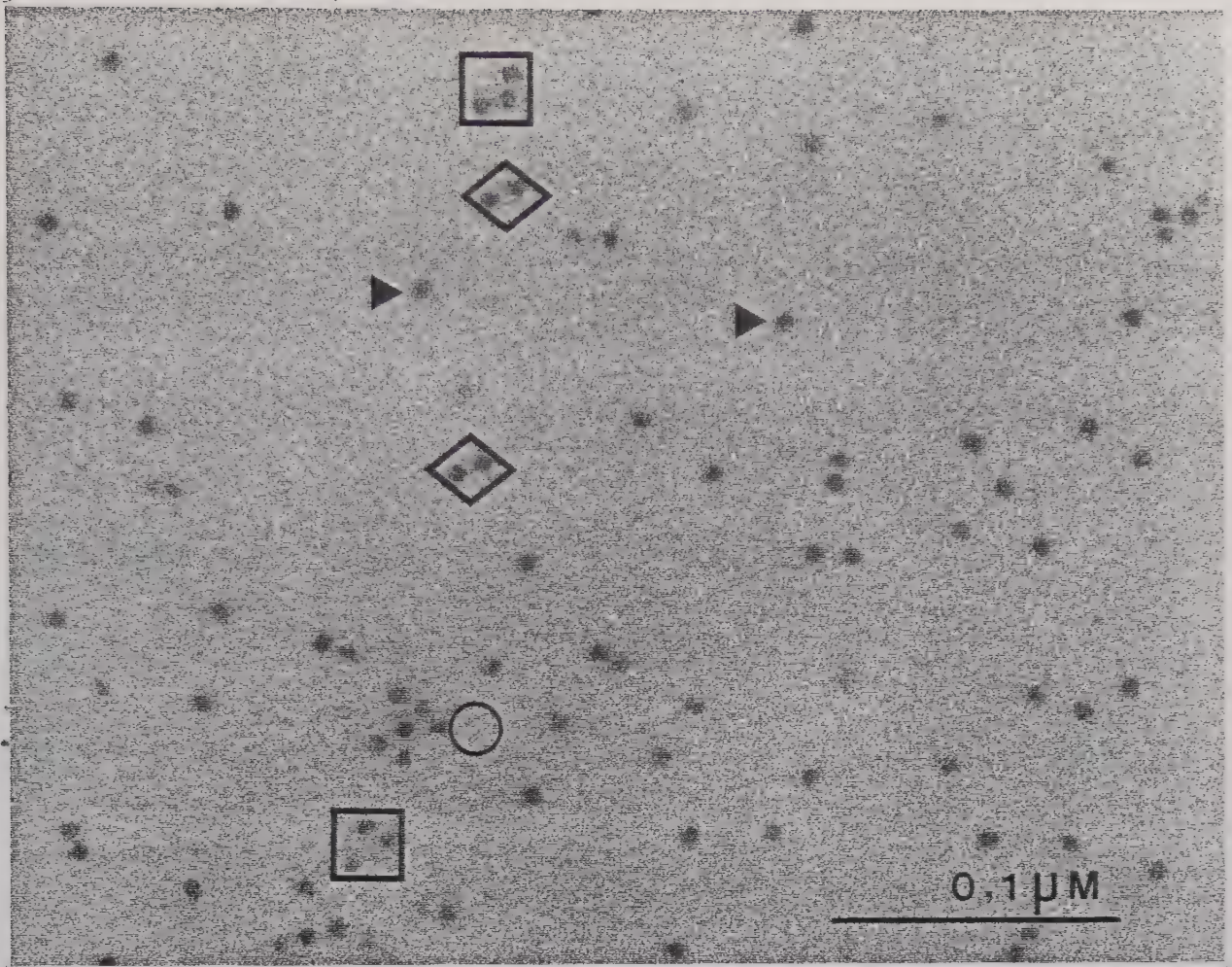


Abbildung 11.: Absorbat von chromatographiertem Fe^+ auf einen Formvar- Kohlefilm

1. Pfeile: monomere Fe^+ -Moleküle
2. Trapeze: dimere Fe^+ -Moleküle
3. Quadrate: trimere Fe^+ -Moleküle
4. Kreis: oligomeres Fe^+ -Molekül

Wenn der Abstand zwischen den Eisenkernen des Fe^+ kleiner als 12 nm war, wurden die Partikel als Di-, Tri- oder Oligomere beurteilt.

Film adsorbierten Fe^+ -Partikel. Beurteilt man die Partikelverteilung durch ein statistisches Zählverfahren, indem die Par-

tikelzahl pro Einheitsfläche (Zählquadrate von 1100 nm^2 oder 10000 nm^2) bestimmt wird, so können die beobachteten Partikelhäufigkeiten durch eine Poisson-Verteilung approximiert werden (Abb. 12, a und b), das heißt, die Partikel erscheinen homogen verteilt (SACHS, 1974). Die etwa 30% Di-, Tri- und Oligomeren werden somit durch das statistische Prüfverfahren unter zwei verschiedenen Zählbedingungen nicht erkannt. Fe^+ -Partikel dieser Qualität wurden für alle Versuche verwendet.

3.2 Abhängigkeit der Fe^+ -Bindung von der Fe^+ -Konzentration im Ansatz

Im Konzentrationsbereich von etwa $10^{-7} - 10^{-6} \text{ mol/l Fe}^+$ (MG ca. 750 000 Dalton; FANKUCHEN, 1943) zeichnet sich eine lineare Abhängigkeit der Flächendichte der Fe^+ -Partikel (= Anzahl der Fe^+ -Moleküle pro Flächeneinheit der Latexoberfläche) von der Fe^+ -Konzentration im Ansatz ab. Einer Konzentrationsabstufung von 4 (0,06 mg Fe^+ /ml) : 2 (0,03 mg Fe^+ /ml) : 1 (0,015 mg Fe^+ /ml) entspricht das Verhältnis der mittleren Partikelzahl pro Flächeneinheit von ebenfalls etwa 4 : 2 : 1 (Tabelle 2).

Bei Konzentrationen über 0,3 mg Fe^+ /ml im Ansatz wurde keine

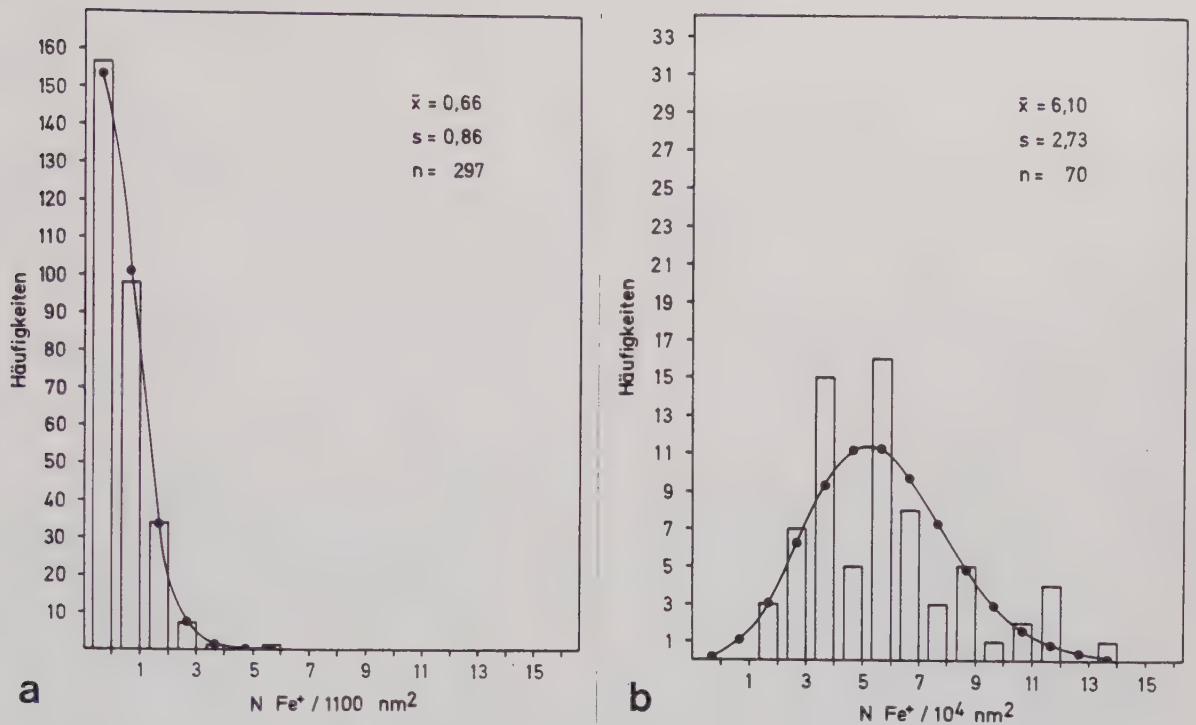


Abbildung 12.: Partikelverteilung der auf einen Formvar-Kohlefilm adsorbierten Fe^+ -Partikel nach Chromatographie über eine Sepharose 6-B Säule. Die empirische Verteilung (Säulen) wurde mit der aus den Mittelwerten berechneten Poisson-Verteilung verglichen. Die $\hat{\chi}$ -Werte weisen auf eine Übereinstimmung hin.

a.) Zählquadrante 1100 nm^2 , $\hat{\chi}^2 = 0,16$ ($\chi^2_{0.05, 2\text{FG}} = 5,99$)

b.) Zählquadrante 10000 nm^2 , $\hat{\chi}^2 = 12,53$ ($\chi^2_{0.05, 6\text{FG}} = 12,59$)

lineare Zunahme der Partikelzahl pro Fläche mehr gesehen. Unter $0,01 \text{ mg Fe}^+/\text{ml}$ geht die Partikeldichte gegen Null.

In Abbildung 13 a - d sind die Partikeldichten entsprechend den

Tabelle 2 : Bindung von Fe^+ an Polystyrol-Latex (ϕ etwa 1 μm)

Fe^+ -Konzentration im Ansatz		0,3 mg/ml	0,06 mg/ml	0,03 mg/ml	0,015 mg/ml	0,003 mg/ml
Abdruck 1	$\bar{x}_1$	15,05	8,92	5,6	2,64	0,28
	s ²	14,14	22,18	9,3	4,28	0,69
	n	211	390	258	419	329
Abdruck 2	$\bar{x}_2$	14,48	9,78	4,39	2,47	0,39
	s ²	22,09	24,40	6,55	10,11	2,53
	n	314	307	285	419	143
Abdruck 3	$\bar{x}_3$	15,88	10,98	5,83	2,81	0,18
	s ²	19,36	21,72	15,13	8,35	0,36
	n	306	340	311	427	160
Abdruck 4	$\bar{x}_4$	14,11	-	5,38	-	-
	s ²	18,49	-	7,45	-	-
	n	262	-	288	-	-
	$\bar{x}_{1-4}$	14,88	9,89	5,3	2,64	0,28
	s	0,77	1,03	0,63	0,17	0,11
	n	4	3	4	3	3

zu Tabelle 2.: $\bar{x}$ = mittlere Zahl von Fe^+ -Partikeln pro 10000 nm^2 ; n = Anzahl der gezählten Quadrate; s^2 = Varianz, wird angegeben, da sich mit $s^2/\bar{x}$ die Approximierbarkeit der Partikelverteilung an eine Poisson-Verteilung abschätzen läßt (SACHS, 1974).



a) 0,015 mg Fe^+ / ml

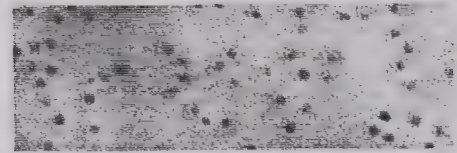


b) 0,03 mg Fe^+ / ml

100 nm



c) 0,06 mg Fe^+ / ml



d) 0,3 mg Fe^+ / ml

Abbildung 13.: a.) - d.) Kohleabdrücke von der Latex-Oberfläche nach Fe^+ Inkubation, unterschiedliche Partikeldichten entsprechend der verschiedenen Fe^+ -Konzentrationen
 e.) - h.) Häufigkeitsverteilungen der Partikeldichten entsprechend der verschiedenen Fe^+ -Konzentrationen
 Näheres zu a.) - h.) siehe im Text

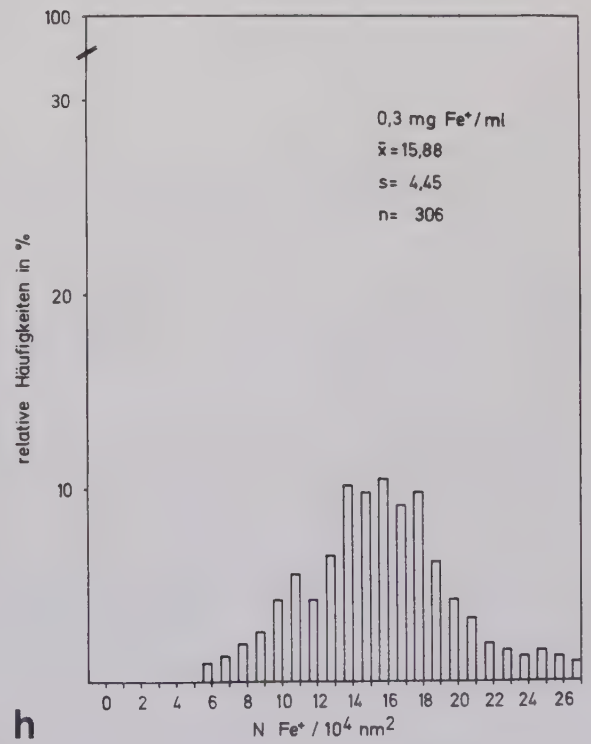
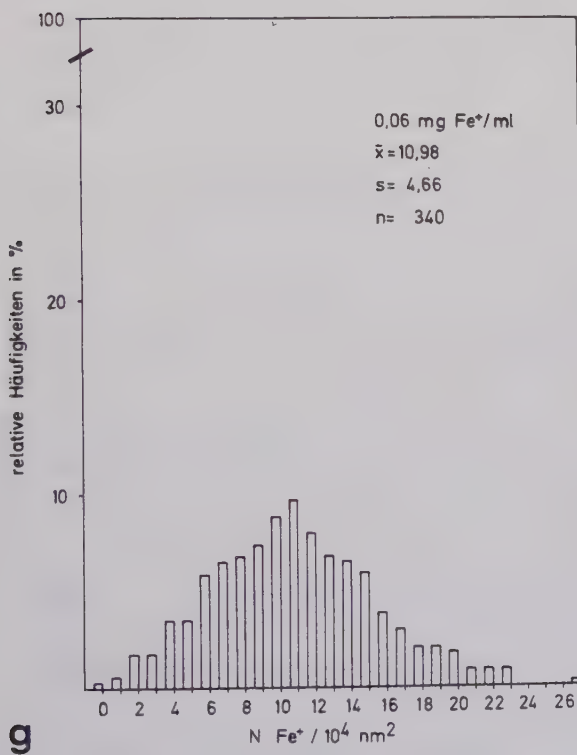
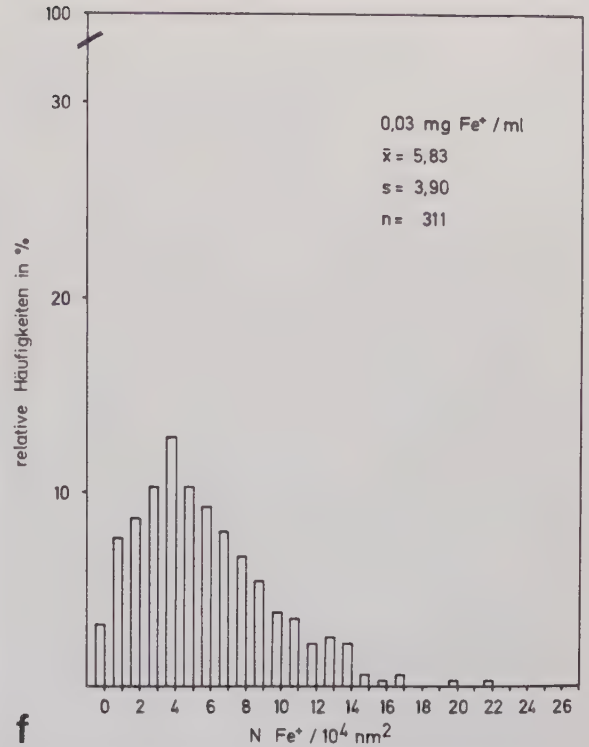
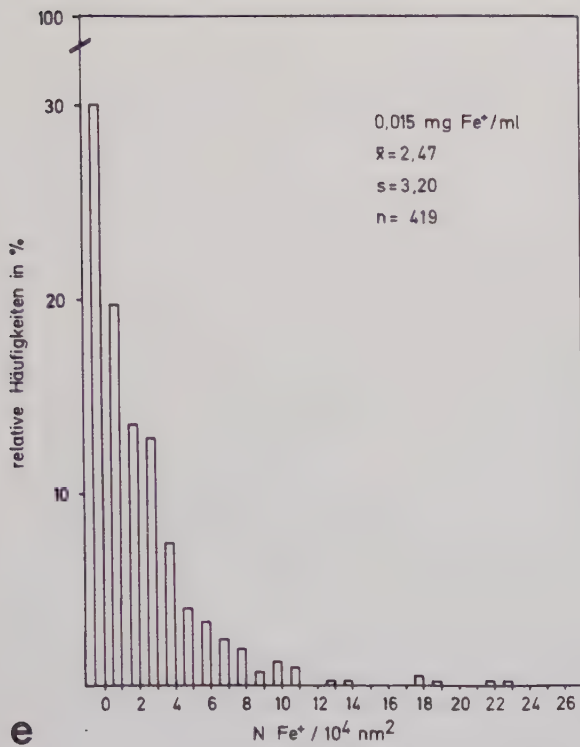


Abbildung 13.: e - h

verschiedenen Fe^+ -Konzentrationen dargestellt. Die Kohleabdrücke geben die Partikelverteilung auf der Latexoberfläche wieder. Versucht man durch Projektion die Verhältnisse in einem Schnitt von ca. 100 nm Dicke (siehe Abb. 13 a - d) abzuschätzen, so zeigt sich, daß bei Partikeldichten von ca. $15/10^4 \text{ nm}^2$ bereits ca. 20% der Partikel durch Parallelprojektion anderer Partikel superponiert werden und im Schnittpräparat daher nicht mehr gezählt werden. Bei Partikeldichten unter 10 wird der Superpositionseffekt bei annähernd homogener Partikelverteilung vernachlässigbar klein, so daß auch am Ultradünnschnitt eine quantitative Auswertung erfolgen könnte.

In Abbildung 13 e - h sind zu den Bildbeispielen 13 a - d die entsprechenden Häufigkeitsverteilungen der Partikeldichten der einzelnen Meßserien dargestellt. Vergleicht man die beobachteten Häufigkeitsverteilungen mit Poisson-Verteilungen der gleichen Mittelwerte als Modell für eine homogene Partikelverteilung, so ergibt sich, daß nur der Partikelbesatz entsprechend der höchsten Fe^+ -Konzentration bei einem Teil der Abdrücke durch eine Poisson-Verteilung approximierbar ist (siehe Tab. 2). Die Partikelverteilungen, die bei niedrigeren Fe^+ -Konzentrationen beobachtet werden, sind auf der Grundlage der Poisson-Verteilung nicht mehr als homogen zu werten.

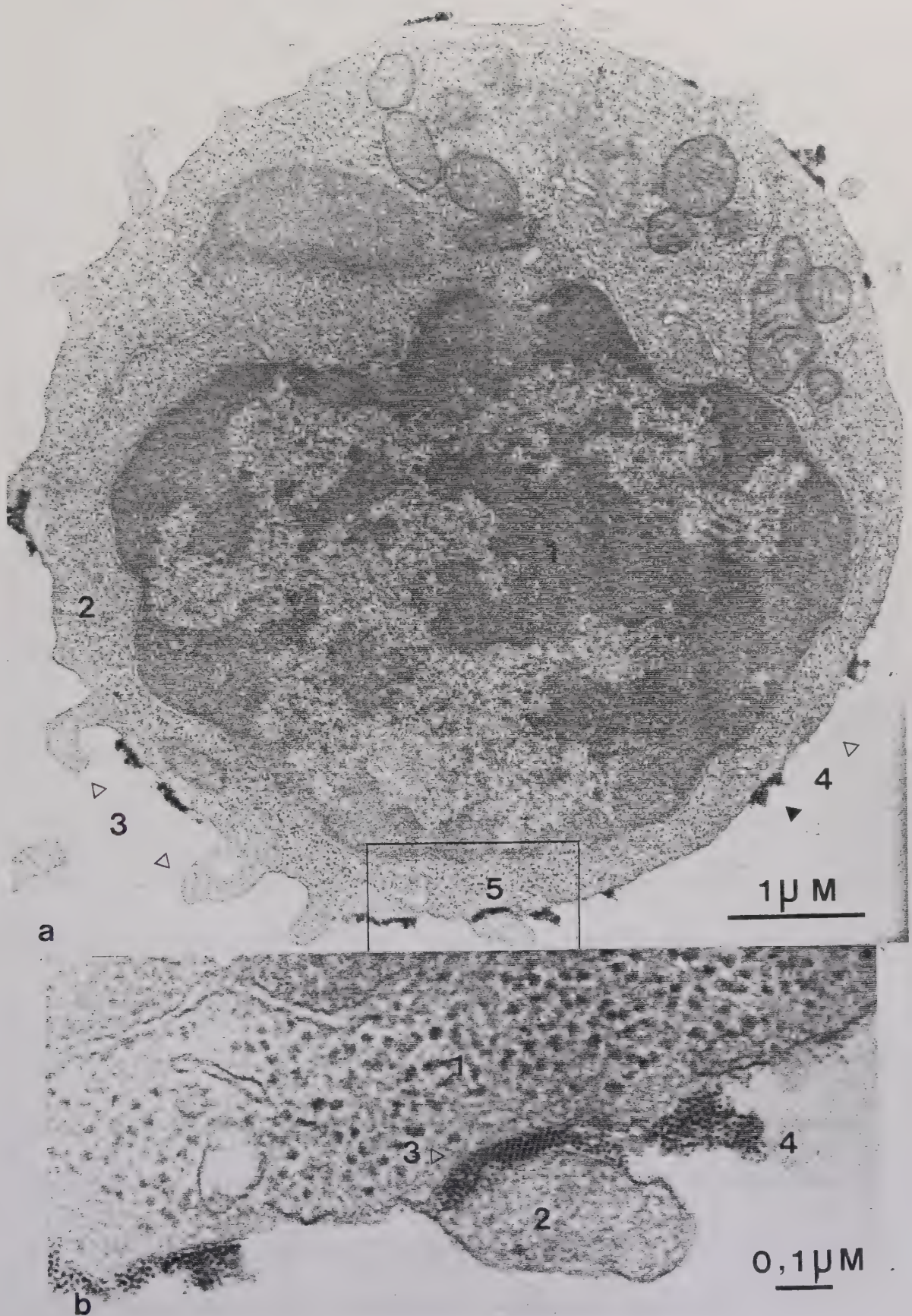


Abbildung 14.: a und b) Bildunterschrift siehe nächste Seite

Abbildung 14.: a.) Lymphozyt, Inkubation mit Fe^+ bei 4°C ohne Vorfixierung

1. Zellkern, 2. Zytoplasma, 3. Zellausläufer, 4. Wechsel von Oberflächenbezirken mit und ohne Fe^+ -Besatz, Fe^+ -Aggregate, 5. kristalliner Fe^+ -Besatz zwischen einer Zellfalte

b.) Ausschnitt von 14 a.) (Kasten 5.)

1. Zytoplasma, 2. Zellausläufer, 3. kristalline Anordnung des Fe^+ -Besatzes in Form einer Kugeldichtestpackung zwischen Zellausläufer und -oberfläche, 4. Fe^+ -Aggregat

3.3. Markierung der Zelloberfläche mit Fe^+ in Abhängigkeit von der Fixierung

a.) vor Fixierung

Die Reaktion von Fe^+ mit Zelloberflächen von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten ergibt bei 4°C (Abb. 14 a u. b), RT und 37°C (Abb. 15 a u. b), qualitativ an Ultradünnschnitten abgeschätzt, vergleichbare Befunde.

Die Fe^+ -Partikel befinden sich, dicht gepackt, in unterschiedlich ausgedehnten Arealen der Zelloberfläche. Die Zellausläufer sind selten mit Fe^+ besetzt. In Falten der Zelloberfläche (Abb. 14 b) oder zwischen Zellaggregaten werden teilweise kristalline Anordnungen der Fe^+ -Partikel, ähnlich einer Kugeldichtestpackung, beobachtet. An diesen Stellen werden etwa 80

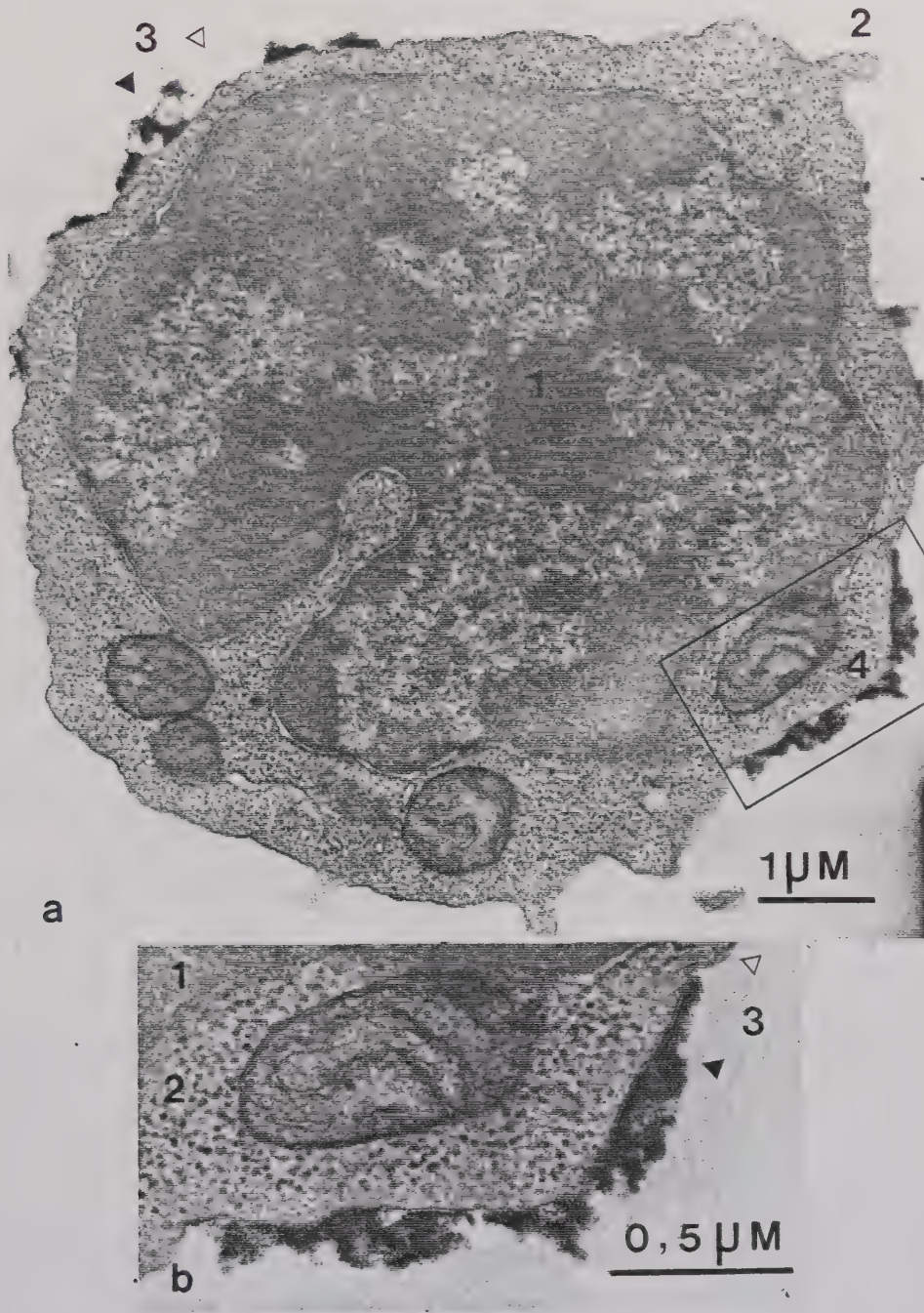


Abbildung 15.: a.) Lymphozyt, Inkubation mit Fe^+ bei 37°C ohne Vorfixierung

1. Zellkern, 2. Zellausläufer, 3. Fe^+ -Aggregate im Wechsel mit nicht besetzten Oberflächenanteilen, 4. größeres Fe^+ -Aggregat

b.) Ausschnitt von 15 a.) (Kasten 4.)

Abbildung 15.: b.) 1. Zellkern, 2. Zytoplasma mit Monoribosomen, 3. Fe^+ -Aggregat, daneben unbesetzter Oberflächenanteil

Fe^+ -Partikel pro 10^4 nm^2 gezählt (Durchmesser eines Ferritinmoleküls entspricht 12 nm; BIELIG et al, 1966; HAHN und BAUMEISTER, 1974).

Um abzuschätzen, ob bei 4° C und 37° C unterschiedlich große markierte Areale gebildet werden, wurde an je 50 Schnitten von Lymphozyten, die bei 4° C und 37° C 1 Stunde bei der jeweiligen Temperatur äquilibriert und 2 min mit Fe^+ inkubiert worden waren, die Breite der mit Fe^+ besetzten Plasmamembranabschnitte in Relation zur gesamten Plasmamembran gemessen. Es konnte kein Unterschied statistisch abgesichert werden (Abb. 16. a u. b).

Aufgrund dieses Befundes wurden alle weiteren Inkubationsansätze mit Fe^+ bei 4° C durchgeführt.

Zellen, die morphologisch erkennbar geschädigt waren, oder sich bereits im Stadium der Lyse befunden haben, waren ebenfalls mit Fe^+ markiert (Abb. 17 a und b). Allerdings zeigte der Oberflächenbesatz hier eine andere Verteilung. Bei diesen Zellen waren die gesamte Zelloberfläche sowie freiliegende Zellorganellen lückenlos mit einem dichten, mehrschichtigen Fe^+ -Besatz besetzt.

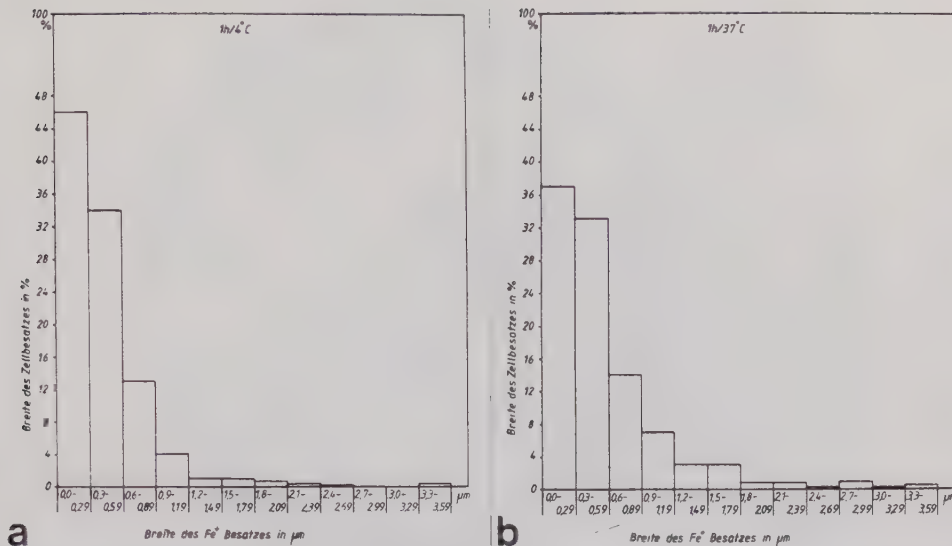


Abbildung 16.: a und b) Häufigkeitsverteilung des seggregierten Fe^+ -Besatzes auf der Lymphozytenoberfläche.

Es wurden je 50 nicht vorfixierte Lymphozyten planimetriert, die bei 4°C (a.) und 37°C (b.) 1 Stunde äquilibriumiert und mit Fe^+ (Konzentration im Ansatz: 0,3 mg/ml) 2 min inkubiert wurden. Die Breite der Fe^+ -Aggregate wurde an Ultradünnschnitten von 600 - 900 Å Dicke, entsprechend der Interferenzfarbe Silber, im Verhältnis zum Gesamtumfang der Zelle gemessen. Der Auftrag, auf der Abszisse erfolgte in 0,3 μm Schritten. Bei beiden Temperaturvarianten bestanden über 90% der Fe^+ -Aggregate aus kleinen Häufchen bis zu ca. 1,5 μm Breite. Großflächige Aggregationen wie "caps" oder "patches" wurden nicht beobachtet.

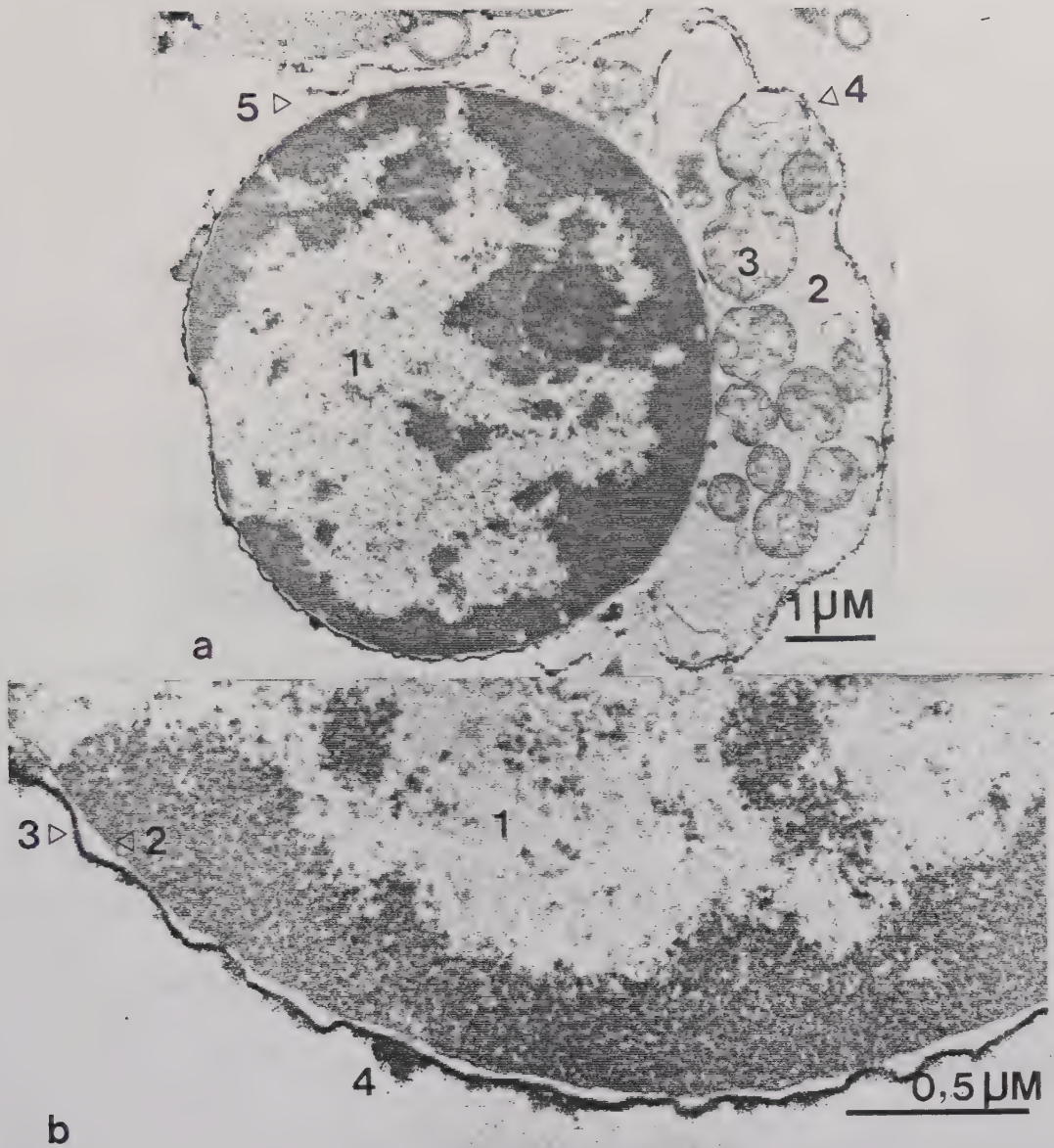


Abbildung 17.: a.) Lymphozyt im Stadium der Lyse, Fe^+ -Inkubation eines unfixierten Präparates
 1. Zellkern mit aufgelockerter Chromatinstruktur; die frei liegende äußere Kernmembran ist ebenfalls mit Fe^+ besetzt, 2. strukturloses, aufgehelltes Zytoplasma, 3. aufgetriebene Mitochondrien, 4. vollständiger, dichter Fe^+ -Besatz auf der Zelloberfläche, 5. Bereich, in dem Zytoplasma und Zellmembran bereits aufgelöst sind.

Abbildung 17.: b.) Ausschnitt von 17 a.) (Kasten 5.)

1. Zellkern, 2. innere, 3. äußere Kernmembran mit z.T. einschichtigem Fe^+ -Besatz, 4. teilweise Fe^+ -Aggregate auf der Kernmembran

b.) nach Formaldehydfixierung

Nach Vorfixierung mit FA waren in der Zellsuspension nach zweimaligem Waschen mit fuchsin-schwefliger Säure keine freien Aldehydgruppen mehr nachweisbar (Tabelle 3). In solchen Präparaten wurde nach Reaktion mit Fe^+ sowohl bei 4°C als auch bei RT ein Fe^+ -Besatz auf der Zelloberfläche beobachtet, der dem von nicht vorfixierten Zellen ähnlich war. Die Fe^+ -Partikel fanden sich auch hier dicht gepackt in unterschiedlich großen Arealen der Zelloberfläche. Auch Anordnungen in Form einer Kugeldichtestpackung kamen vor (Abb. 18 a u. b). Bisweilen waren Abschnitte der Zelloberfläche mit kleineren Aggregaten von Fe^+ zu beobachten, die sich in der Aufsicht mosaikartig darstellten (Abb. 19).

c.) nach Glutaraldehydfixierung

Nach Vorfixierung mit GA wurde ebenso, wie nach Vorfixierung mit FA der überschüssige Aldehyd durch zweimaliges Waschen entfernt. In einem Aliquot der Zellsuspension waren mit fuchsin-schwefliger Säure keine freien Aldehydgruppen mehr nachweis-

Tabelle 3 : Test auf freie Aldehydgruppen mit fuchsinchwefliger Säure

Vorfixierung mit:	GA		GA + NH ₄ Cl		FA	Ø
	+ 1% BSA	- 1% BSA	+ 1% BSA	- 1% BSA		
1 x waschen ^Φ)						
1 min	schwach	Ø	Ø	Ø	stark	Ø
5 min	sehr schwach	Ø	Ø	Ø	mittel	Ø
10 min	Ø	Ø	Ø	Ø	schwach	Ø
2 x waschen ^Φ)						
1 min	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

10 - 20 x 10⁶ Zellen wurden mit GA (EK 2 x 10⁻² mol/l) und FA (EK 0,3 mol/l) mit und ohne BSA im Suspensionsmedium 10 min vorfixiert. Die Zellen wurden durch Sedimentation 2 x gewaschen. ^Φ) Das Zellpellet wurde jeweils in 2 ml Medium mit den angegebenen Zusätzen suspendiert. Nach 1 x waschen wurden 1 min, 5 min und 10 min nach Resuspendierung je 50 µl Zellsuspension zur Prüfung auf freie Aldehydgruppen entnommen. Die Rotfärbung mit fuchsinchwefliger Säure wurde gegen einen weißen Hintergrund qualitativ beurteilt.

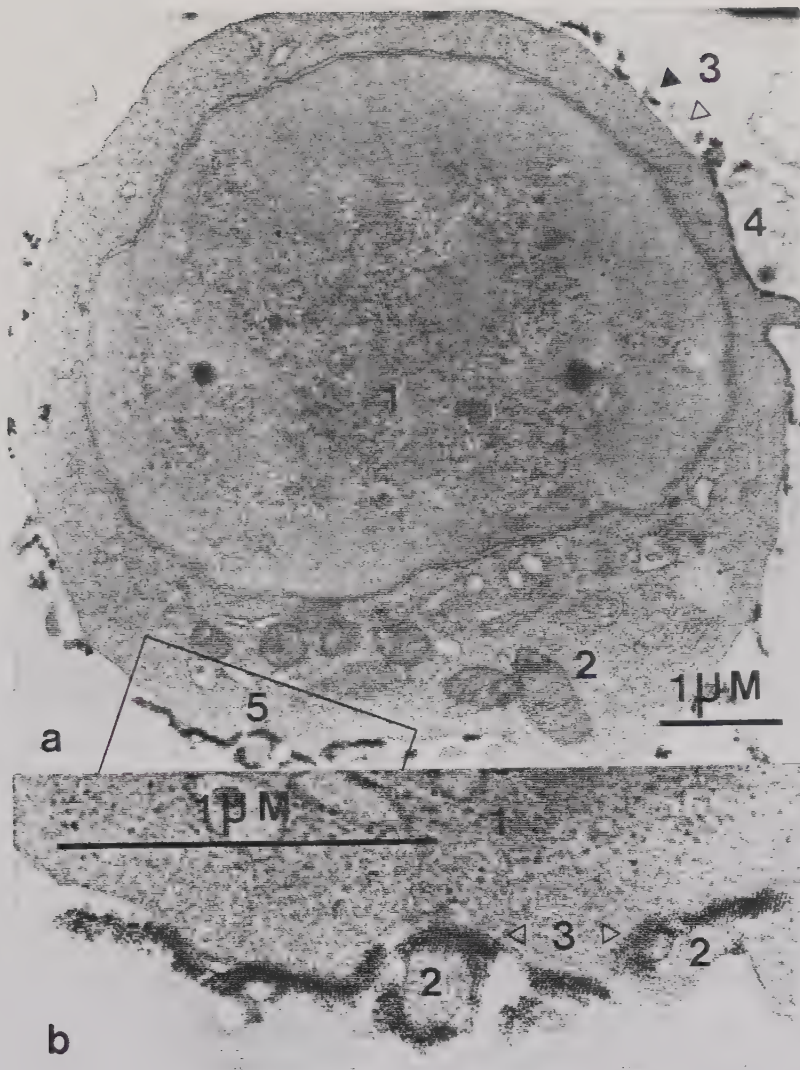


Abbildung 18.: a.) Lymphozyt, Inkubation mit Fe^+ nach FA-Vorfixierung
 1. Zellkern, 2. Mitochondrium, 3. Wechsel von Fe^+ besetzten und nicht besetzten Zelloberflächenanteilen, 4. kristalline Anordnung der Fe^+ -Partikel in Form einer Kugeldichtestpackung zwischen Zelle und einem adhärenen Membranfragment, 5. die Fe^+ -Anordnung zwischen Zellfalten
 b.) Ausschnitt von 18 a.) (Kasten 5.)
 1. Zytoplasma, 2. Zellausläufer, 3. kristalline Anordnung der Fe^+ -Partikel

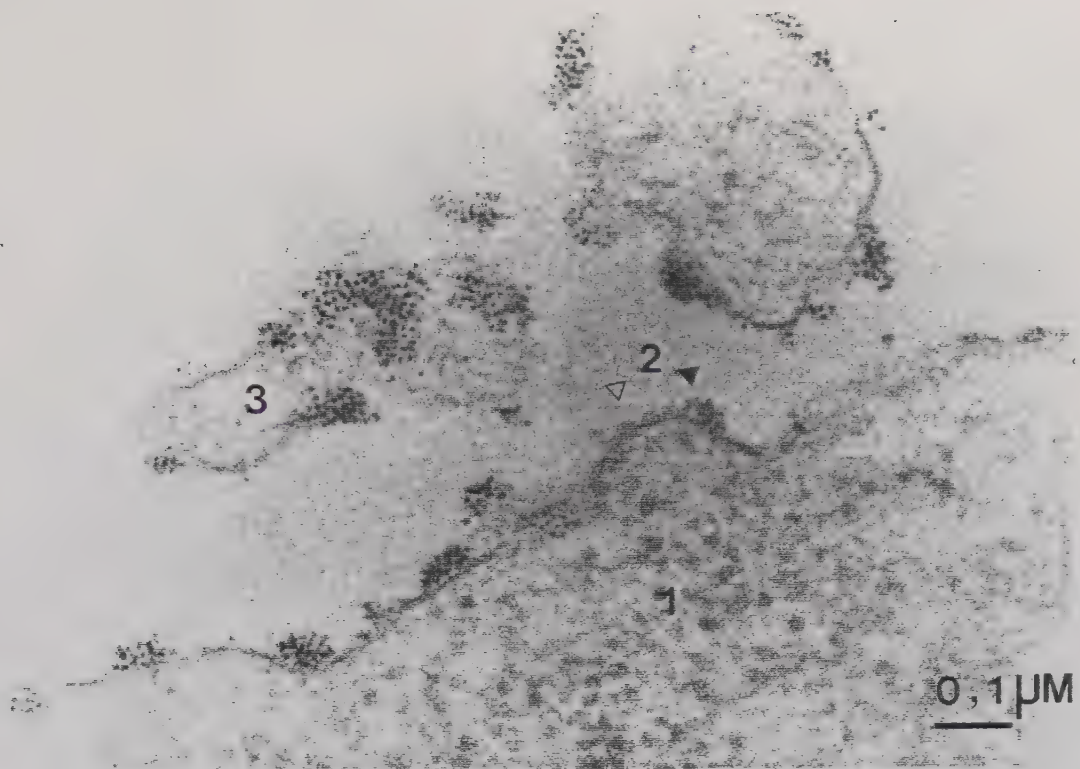


Abbildung 19.: Oberflächenausschnitt von einem Lymphozyten, Inkubation mit Fe^+ nach FA-Vorfixierung
 1. Zytoplasma, 2. mosaikartiger Wechsel von Oberflächenanteilen mit Fe^+ -Aggregaten und unbesetzten Oberflächenanteilen, 3. Tangentialanschnitt eines Zellausläufers, mosaikartige Verteilung des Fe^+

bar (Tabelle 3).

Die Reaktion mit Fe^+ ergab bei einer Endkonzentration im Ansatz von 0,3 mg/ml Fe^+ bei Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten bei 4° C, RT und 37° C einen lückenlosen Besatz der gesamten Zelloberfläche, inklusive der Zellausläufer und Microvilli (Abb. 20 a u. b; sowie 21 a und 22 a). In Flächenschnitt-

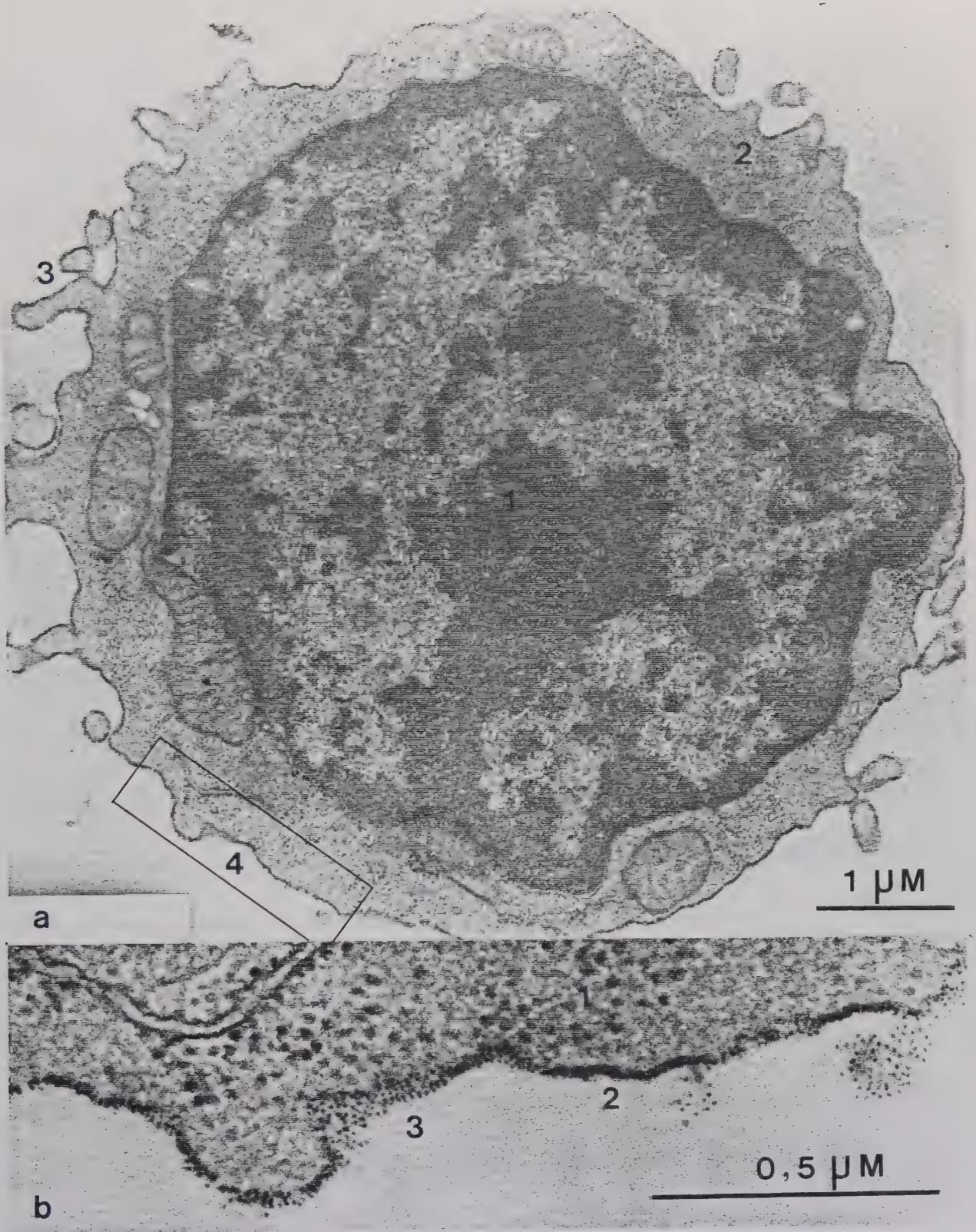


Abbildung 20.: a.) Lymphozyt, Inkubation mit Fe^+ (Endkonzentration im Ansatz 0,3 mg/ml) nach GA-Vorfixierung

Abbildung 20.: a.) 1. Zellkern, 2. Zytoplasma, 3. Zellausläufer, 4. vollständiger Oberflächenbesatz, auch der Zellausläufer

b.) Ausschnitt von 20 a.) (Kasten 4.)

1. Zytoplasma, 2. vollständiger Fe^+ -Besatz der Zelloberfläche, 3. im Tangentialflächenanschnitt einer Zellfalte ebenfalls vollständiger Besatz

ten zeigte sich eine homogene Partikelverteilung. Dieser homogene Oberflächenbesatz mit Fe^+ ließ sich in Serienschnitten über größere Oberflächenbereiche verfolgen.

In Zellpopulationen von unterschiedlichen Spendern wurden durchschnittlich 40 - 50 Fe^+ -Partikel pro 10^4 nm^2 gezählt.

Bei Verringerung der Fe^+ -Konzentration um den Faktor 10 - 20 ergab sich ein differentes Bild. Auf der Zelloberfläche von Lymphozyten zeigte sich eine auffällige inhomogene Verteilung der Fe^+ -Partikel. An den Spitzen der Zellausläufer fanden sich häufig die höchsten Partikeldichten (Abb. 21 b). Bei den Thrombozyten war der Fe^+ -Besatz ebenfalls inhomogen. Es wurden Thrombozyten beobachtet, deren Plasmamembran über den gesamten Querschnitt einen im Vergleich zu Lymphozyten relativ dichten Fe^+ -Besatz aufwies und keinen auffallenden Dichteunterschied zwischen den Spitzen der Zellausläufer und der Basis zeigten (Abb. 22 b). Daneben wurden Querschnitte von Thrombozyten ohne Fe^+ -Besatz oder mit einem Besatz sehr geringer Dichte beob-

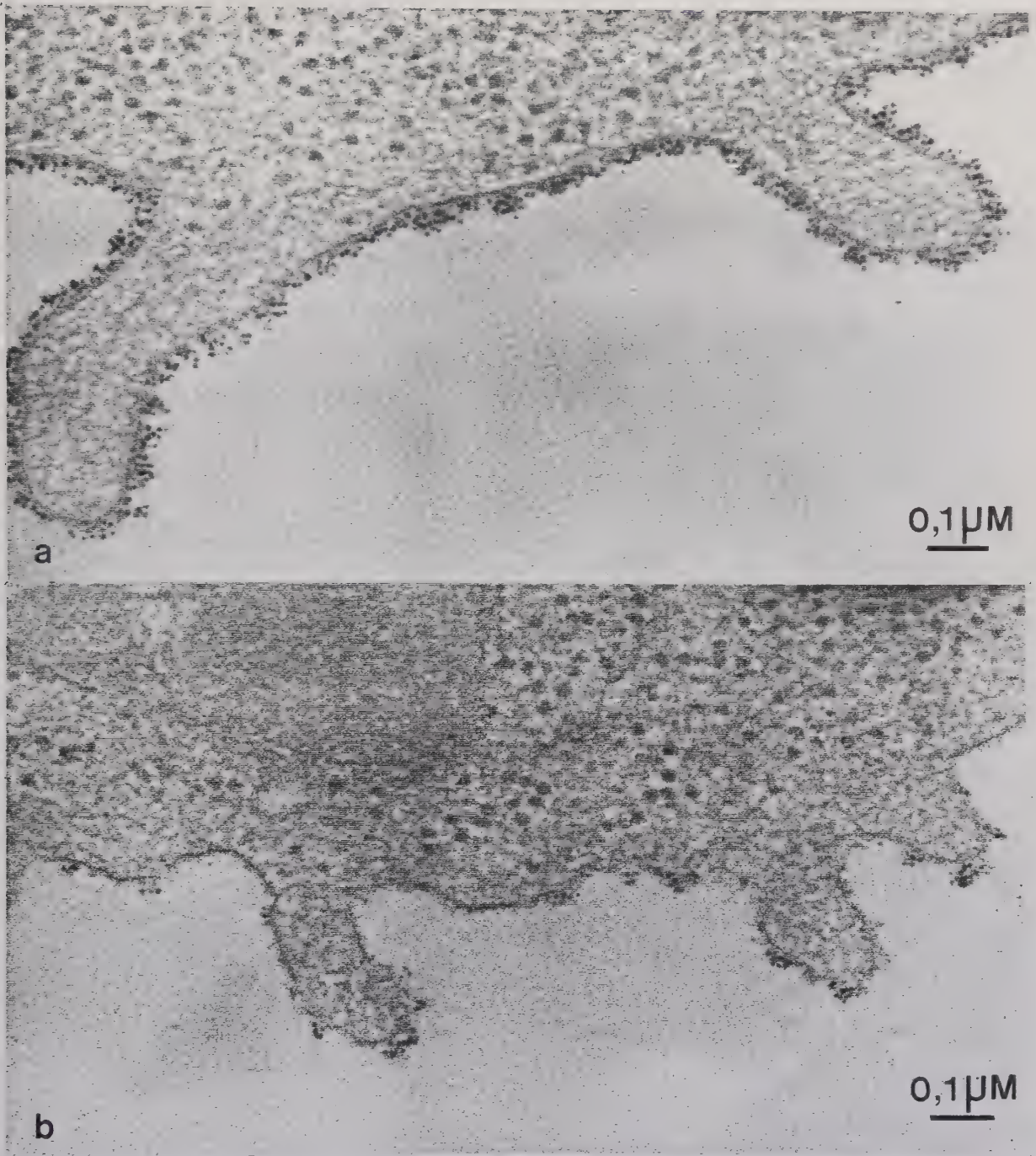


Abbildung 21.: a.) Ausschnitt von einem Lymphozyten, GA-Vorfixierung, Fe^+ -Endkonzentration im Ansatz: 0,3 mg/ml. Die Oberfläche der Zelle, auch die Zellausläufer sind vollständig mit Fe^+ besetzt

b.) wie a.), Fe^+ -Endkonzentration im Ansatz: 0,015 mg/ml. Die Zelloberfläche ist jetzt

Abbildung 21.: b.) nur noch spärlich mit Fe^+ -Aggregaten besetzt. Die Zellausläufer haben die höchste Partikeldichte.

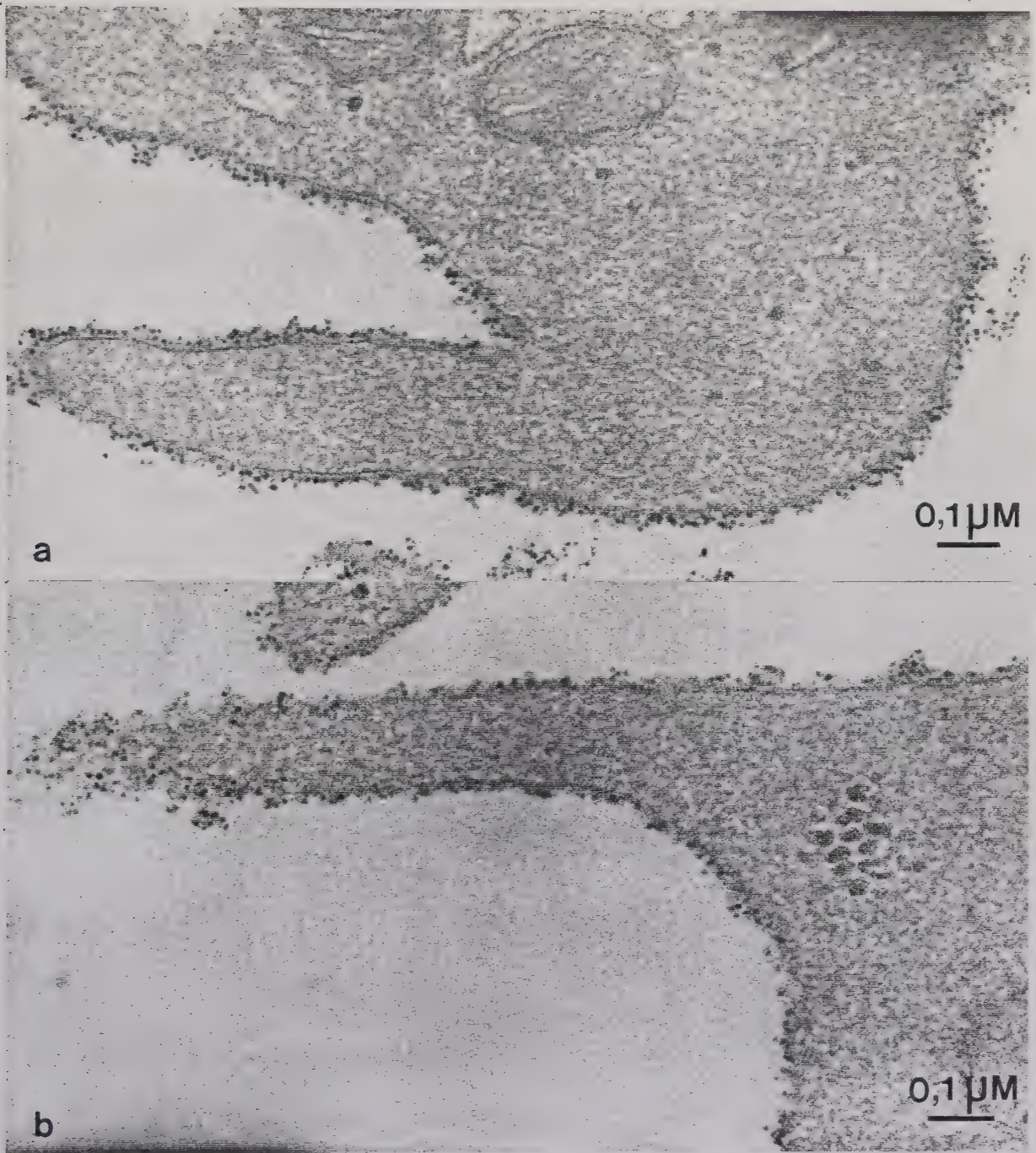


Abbildung 22.: a.) Ausschnitt von einem Thrombozyten, GA-Vor-

Abbildung 22.: a.) fixierung, Fe^+ -Endkonzentration im Ansatz: 0,3 mg/ml. Die Oberfläche der Zelle, auch die Zellausläufer sind vollständig mit Fe^+ besetzt.

b.) wie a.), Fe^+ -Endkonzentration im Ansatz: 0,015 mg/ml. Die Zelloberfläche ist noch relativ dicht mit Fe^+ besetzt (vgl. hierzu Abb. 21 b).

achtet. Außerdem fanden sich Thrombozyten, bei denen nur ein, wenn auch ausgedehnter Teil der quergeschnittenen Plasmamembran relativ dicht besetzt war.

3.4. Einfluß von NH_4^+ -Ionen und primären aliphatischen Aminen

Dem Einsatz von NH_4Cl und aliphatischen Aminen lag ursprünglich der Gedanke zugrunde, freie Aldehydgruppen in vorfixierten Zellsuspensionen über die Bildung von Schiff-Basen zu blockieren, um dadurch eine mögliche, artefizielle Quervernetzung mit dem Fe^+ zu verhindern.

Es zeigte sich, daß sowohl das NH_4^+ -Ion als auch primäre Amine, wenn sie im Überschuß in der Inkubationslösung vorlagen, mit Fe^+ um die negativen Festladungen der Zelloberfläche konkurrierten. Bei den eingesetzten Konzentrationen (0,2 und 0,5 mol/l)

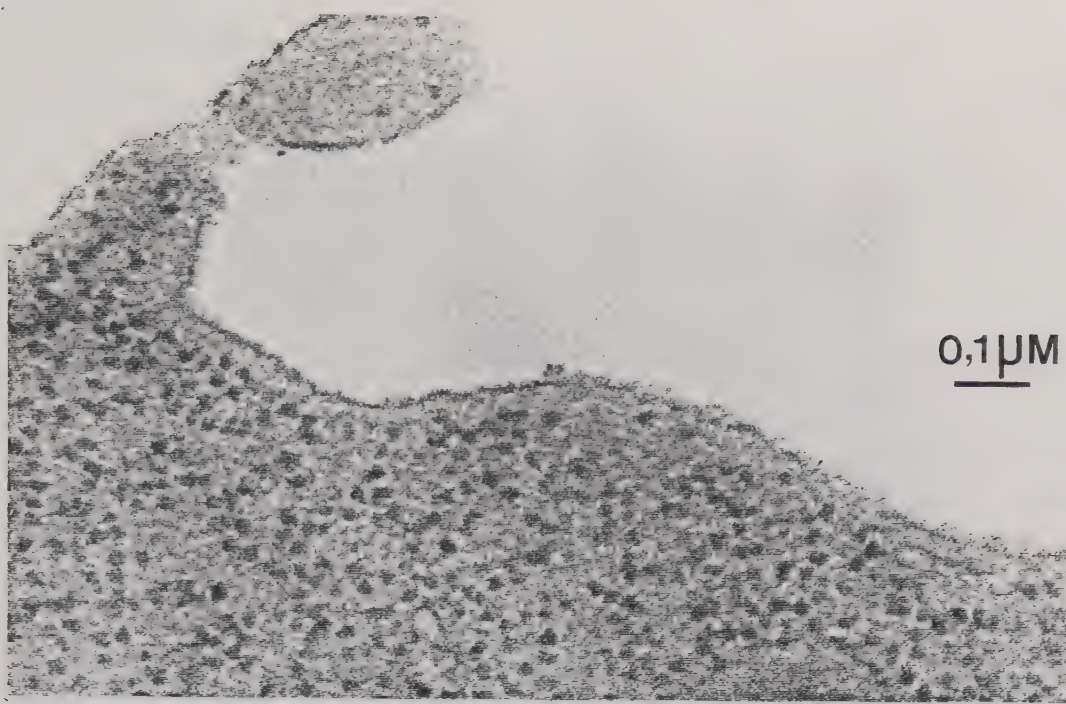


Abbildung 23.: Ausschnitt von einem Lymphozyten, GA-Vorfixierung, Inkubation mit NH_4Cl (Endkonzentration im Ansatz: $2 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$), Fe^+ -Endkonzentration in Ansatz: $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$
Die Zelloberfläche zeigt keine Fe^+ -Bindung

konnten sowohl im GA-vorfixierten wie im nativen Präparat auf der Zelloberfläche keine Fe^+ -Partikel nachgewiesen werden (Abb. 23).

Nach Auswaschen des NH_4Cl respektive Methylamins war die Bindung von Fe^+ an die Zelloberfläche wieder nachweisbar. Es wurden bei $0,3 \text{ mg/ml Fe}^+$ im Inkubationsansatz etwa 50 Fe^+ -Partikel pro 10^4 nm^2 Zelloberfläche bei GA-vorfixierten Zellen gezählt (Abb. 24 a u. b). Das entspricht der Partikeldichte bei GA-vorfixierten Zellen, denen kein NH_4Cl respektive Methylamin zugesetzt wurde.

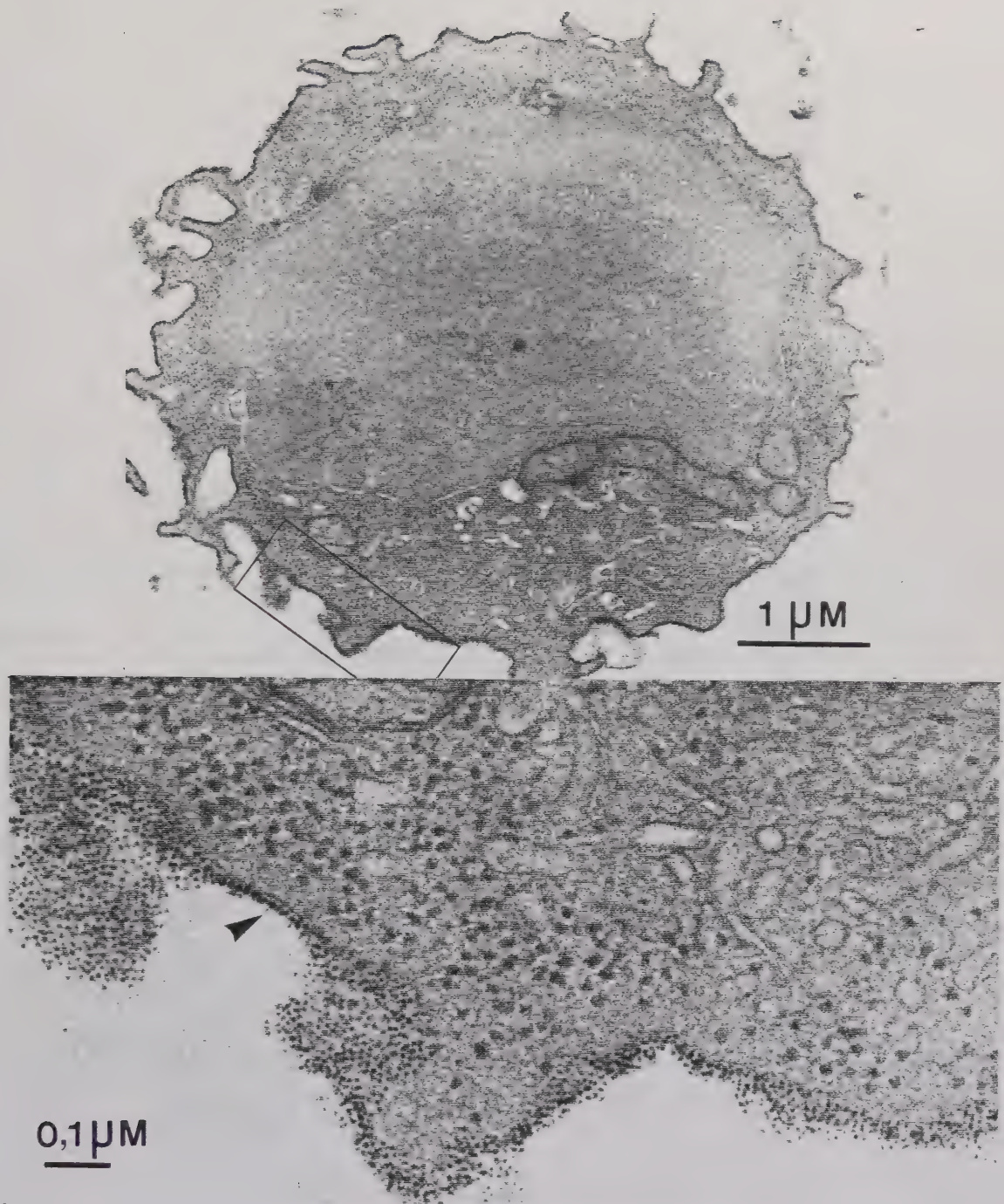


Abbildung 24.: a.) Lymphozyt, GA-Vorfixierung, Inkubation mit NH_4Cl (Endkonzentration im Ansatz: $2 \times 10^{-1} \text{ mol/l}$), Auswaschen des NH_4Cl , Fe^+ -Endkonzentration im Ansatz: $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$. Die Zelloberfläche ist jetzt wieder mit einer dichten Fe^+ Schicht besetzt.

b.) Ausschnitt von a.) (Kasten)
Dichter Fe^+ -Besatz auf der Zelloberfläche,

Abbildung 24.: b.) der sich bei quer getroffener Plasmamembran einschichtig darstellt (Pfeil),
 Fe^+ -Dichte: ca. $50/10^4 \text{ nm}^2$

3.5. Sterische Hinderung der Fe^+ -Reaktion

(Abbau der Zelloberfläche durch Trypsin)

Im Laufe von Untersuchungen über den Abbau der Zelloberfläche durch Trypsin zeigte sich, daß durch Abbauprodukte eine sterische Hinderung der Fe^+ -Reaktion mit der Zelloberfläche eintreten kann.

In Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitten läßt sich erkennen, daß in Zellpräparationen nach 30 min Trypsineinwirkung (Endkonzentration im Ansatz: 20 U/ml) ein Teil der Zellen noch gut erhalten ist. Neben Gebieten, in denen Zellen isoliert im Einbettungsmedium liegen (Abb. 25 a) befinden sich Gebiete, in denen Zellen von einem äußerst schwach anfärbbaren amorphen Material umgeben sind (Abb. 25 b).

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich, daß isoliert liegende, gut erhaltene Zellen vollständig mit Fe^+ besetzt waren, wenn sie mit GA vorfixiert waren (Abb. 26 a u. b).

Die Dichte des Fe^+ -Besatzes war bei trypsinierten Zellen und bei Kontrollen (Abb. 27) gleich (Tabelle 4).

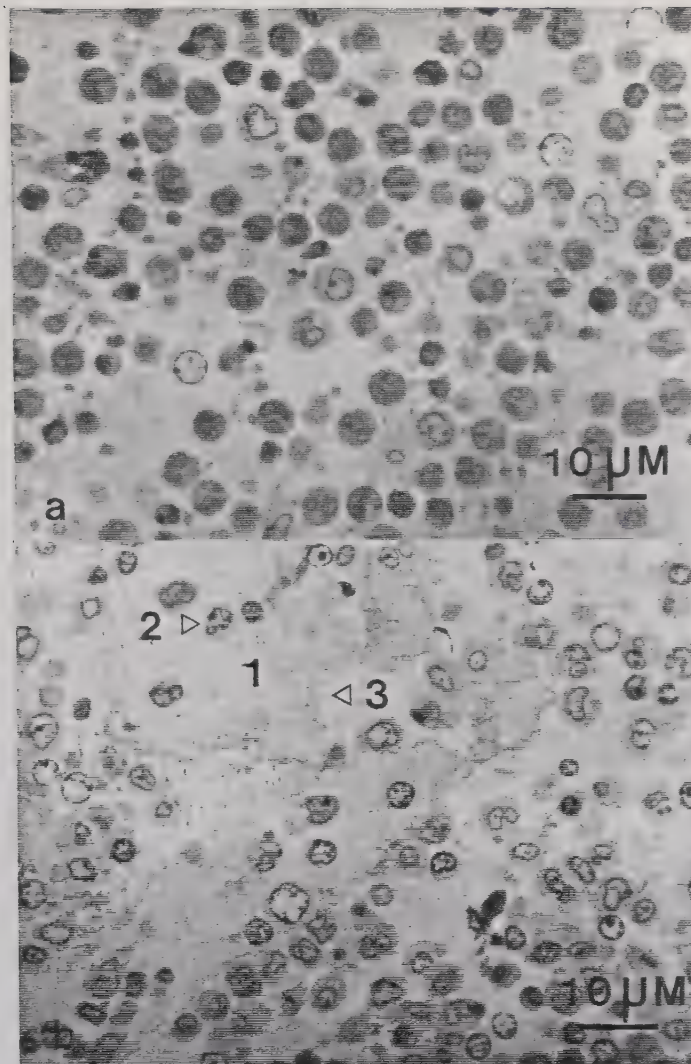


Abbildung 25.: a.) Trypsininkubierte Zellsuspension (30 min),
Semidünnschnitt, Toluidinblau-Färbung
Isoliert liegende Zellen

b.) wie a.), Zellen in Gebieten mit Zelldetritus
1. Gebiet mit schwach anfärbbarem amorphem
Material, 2. darinliegende Zelle, 3. scharfe
Grenze zwischen Zelldetritus und freien Be-
zirken

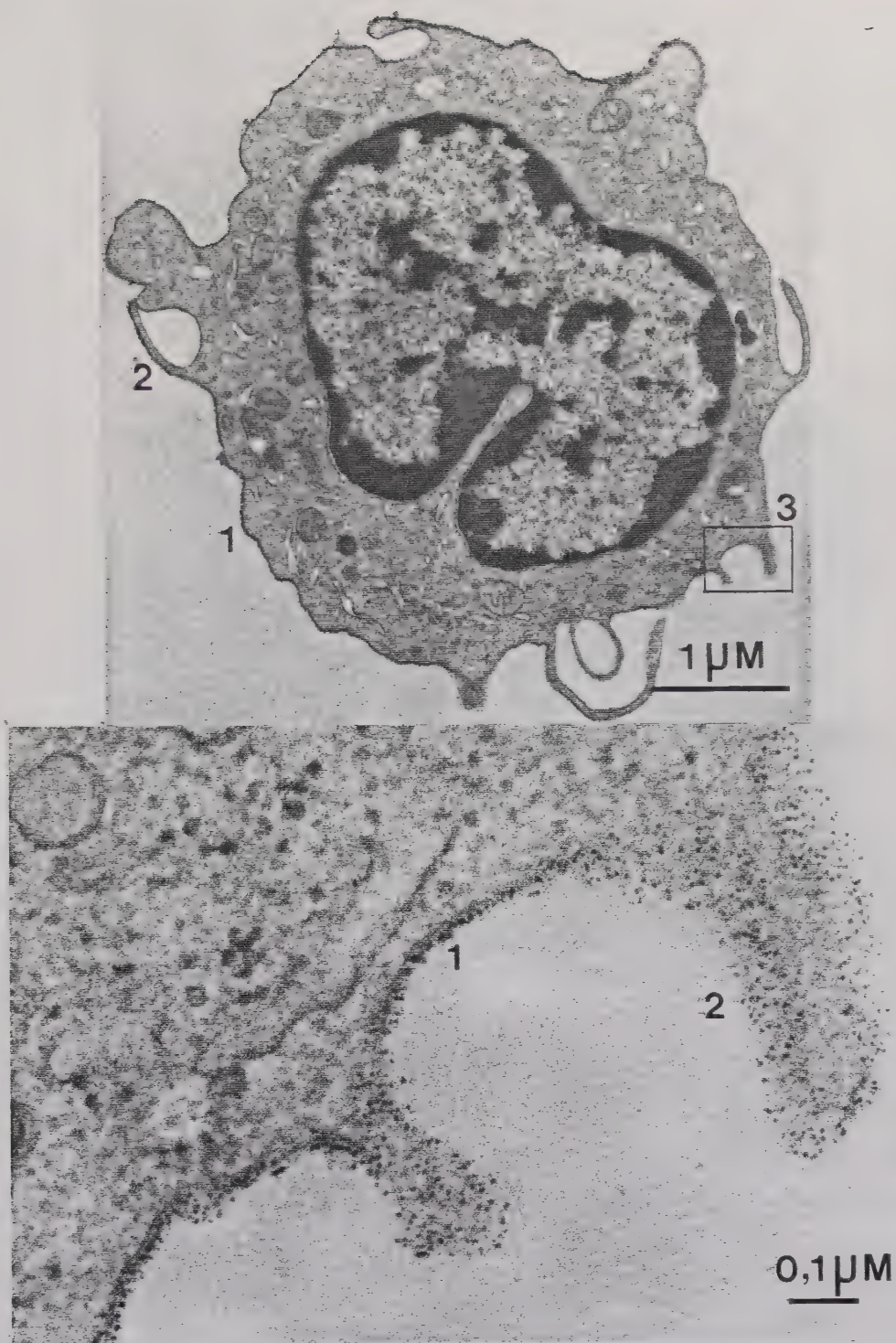


Abbildung 26.: a.) isoliert liegender Lymphozyt, 30 min Trypsin-Inkubation, GA-Vorfixierung, Fe^+ -Konzentration im Ansatz: 0,2 mg/ml
 1. vollständiger Fe^+ -Besatz der Zelloberfläche, 2. Zellausläufer ebenfalls vollständig besetzt

Abbildung 26.: b.) Ausschnitt von a.) (Kasten 3.)

1. vollständiger Fe^+ -Besatz in der Vergrößerung, 2. tangential angeschnittene Zellausläufer mit vollständigem Fe^+ -Besatz, mittlere Partikeldichte ca. $8 \text{ Fe}^+ / 2500 \text{ nm}^2$

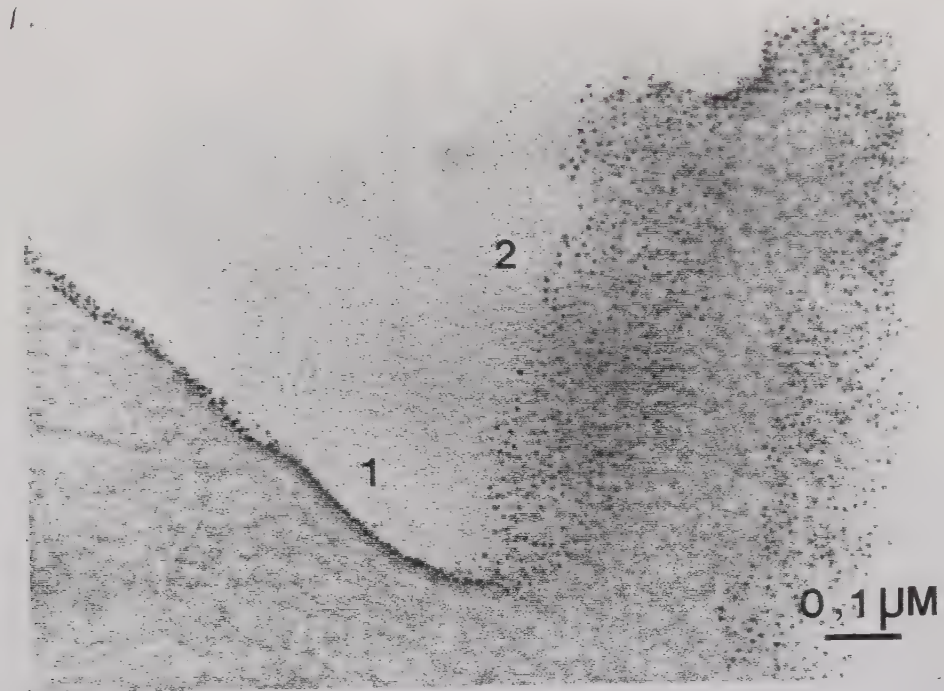


Abbildung 27.: Ausschnitt von einem isoliert liegenden Lymphozyten, nicht tryptisierte Kontrolle, GA-Vorfixierung, Fe^+ -Konzentration im Ansatz: $0,2 \text{ mg/ml}$
 1. quergetroffene Plasmamembran, 2. tangential angeschnittener Zellausläufer.
 Gleiche Fe^+ -Dichte wie bei tryptisierten GA-vorfixierten Zellen (vgl. Abb. 26 b.), mittlere Partikeldichte ca. $8 \text{ Fe}^+ / 2500 \text{ nm}^2$

Tabelle 4: Fe^+ -Partialbesatz von Lymphozytenoberflächen
nach Trypsinbehandlung

		Kontrolle	Trypsin 500 $\mu\text{g/ml}$
Zelle 1	$\bar{x}$	7,48	8,94
	s	2,43	2,62
	n	100	80
Zelle 2	$\bar{x}$	7,63	6,43
	s	2,93	2,39
	n	54	51
Zelle 3	$\bar{x}$	7,86	8,58
	s	2,4	2,33
	n	51	36
Zelle 4	$\bar{x}$	-	6,62
	s	-	2,3
	n	-	74

Unbehandelte und Trypsin-behandelte Zellen wurden in Parallelansätzen nach Vorfixierung mit GA mit Fe^+ markiert. Isoliert liegende Lymphozyten wurden im EM photographiert. An den Flächenschnitten der Zelloberflächen wurden die Anzahl Fe^+ - Partikel/ 2500 nm^2 bestimmt.

Bei Zellen, die nicht mit GA vorfixiert wurden, waren auch nach der Trypsinbehandlung Fe^+ freie Abschnitte der Zelloberfläche neben Abschnitten, in denen die Fe^+ -Partikel dicht gepackt waren, zu beobachten (Abb. 28 a u. b); das heißt, die Zelloberflächen dieser trypsinbehandelten Zellen verhalten sich gegenüber den Liganden wie unbehandelte Zellen.

Die entsprechenden elektronenmikroskopischen Schnitte des in Abb. 25 b dargestellten Gebietes zeigten, daß die schwach gefärbten, amorphen Bereiche aus Zelldetritus und zum Teil aus noch identifizierbaren Zellorganellen wie Mitochondrien, vesikulären Strukturen und auch Kernfragmenten bestanden (Abb. 29 a u. b; Abb. 30 a u. b; Abb. 31 a u. b). Die darinliegenden Zellen erschienen morphologisch intakt. Der Rand des Detritusbereiches war dicht mit Fe^+ besetzt. Der Besatz glich demjenigen von nicht trypsinierten, lytischen Zellen. Innerhalb dieses Gebietes zeigten weder vorfixierte (siehe Abb. 29 a u. b und Abb. 31 a u. b) noch nativ markierte Zellen einen Oberflächenbesatz (Abb. 30 a u. b).

Zellen, die in Randbezirken dieses Detritusbereiches nur mit einem Teil ihres Zellkörpers hineinragten, waren auf dieser Seite nicht mit Fe^+ besetzt, während die freie Zelloberfläche einen Fe^+ -Besatz entsprechend dem Besatzmuster von nativ markierten Zellen (Abb. 30 a u. b) bzw. GA-vorfixierten Zellen

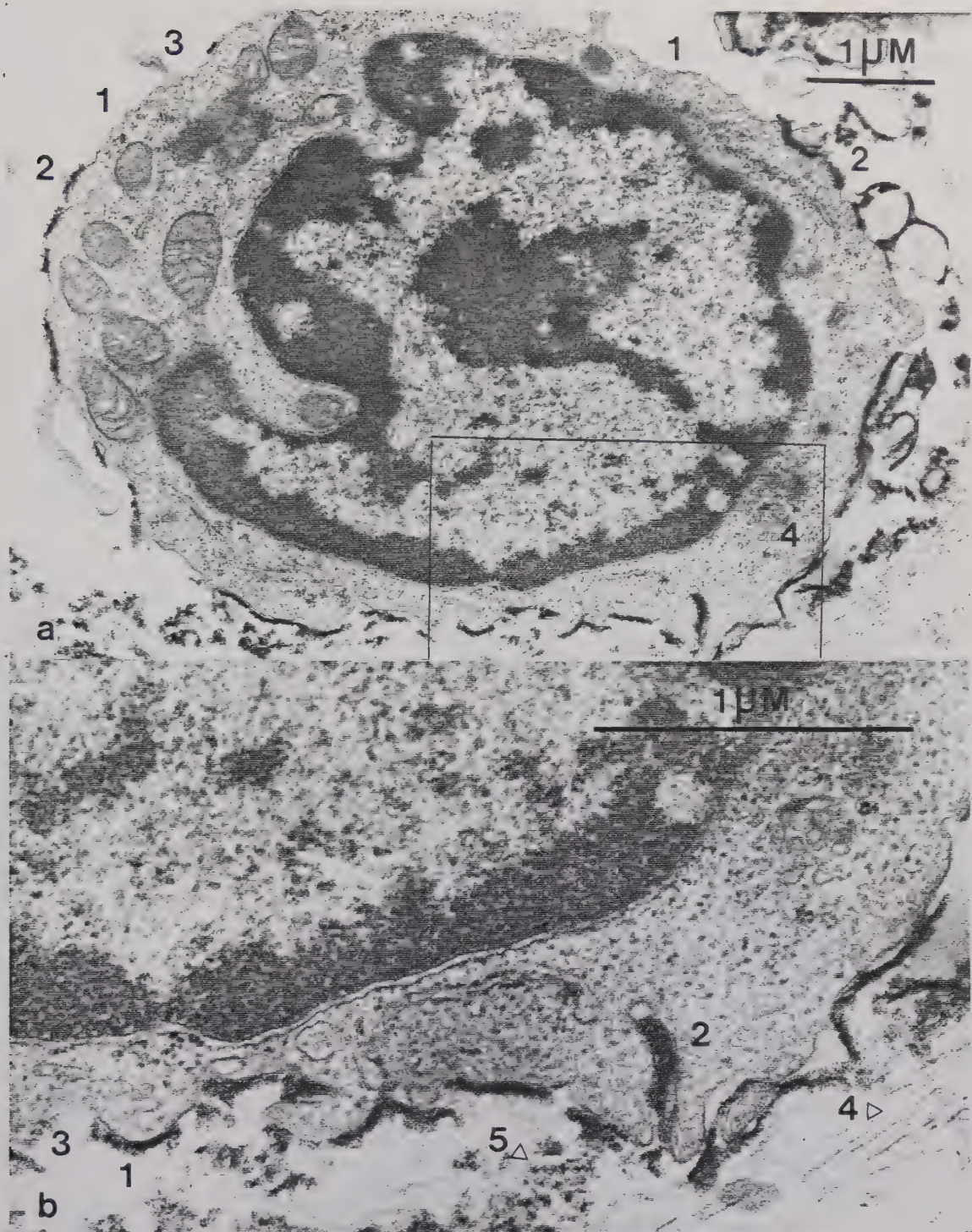


Abbildung 28.: a.) isoliert liegender Lymphozyt, 30 min Trypsin-Inkubation, Markierung mit Fe^+ vor der Fixierung
 1. freie und 2. mit Fe^+ besetzte Oberflächenbezirke, 3. Zellausläufer im

Abbildung 28.: a.) wesentlichen ohne Besatz

b.) Ausschnitt von a.) (Kasten 4.)

1. dicht gepackter Fe^+ -Besatz mit kristalliner Anordnung, vor allem in Zellmembranspalten (2.), 3. Fe^+ freier Oberflächenanteil, 4. amorphes, fädiges Material im Raum zwischen den Zellen, 5. Fe^+ -Besatz auf diesem amorphen Material

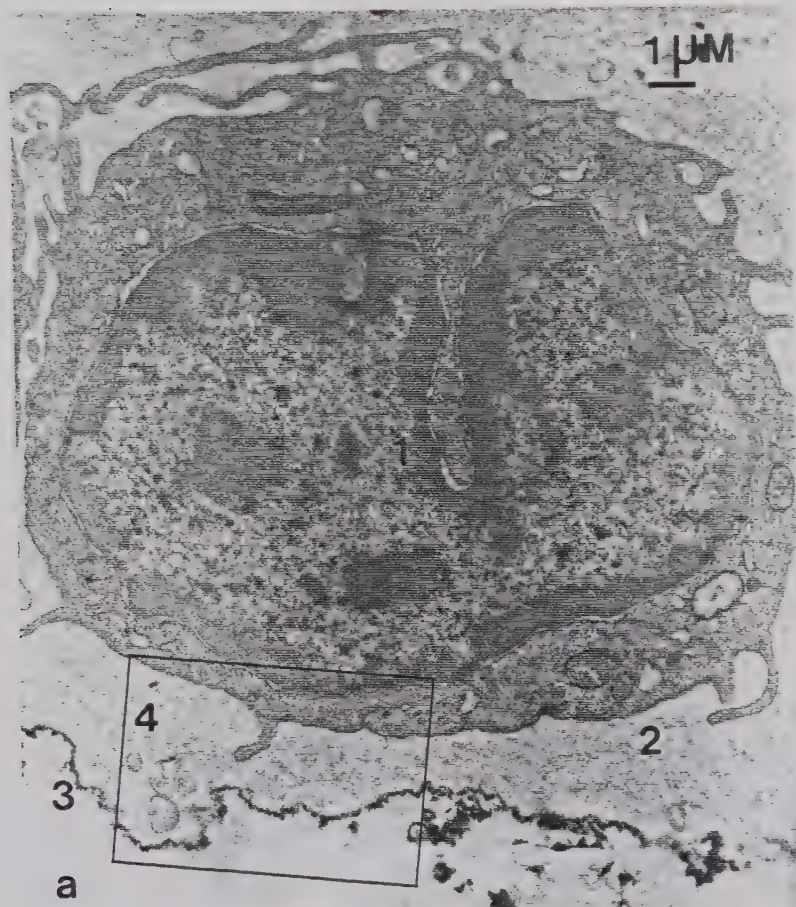


Abbildung 29.: a.) Lymphozyt in Zelldetritus eingebettet, 30 min Trypsin-Inkubation, GA-Vorfixierung, Fe^+ -Markierung

1. Zelle vollständig von Zelldetritus umgeben (2.), 3. scharfe Grenze zwischen Zelldetritus und freien Bezirken (vgl. Abb. 25 b)

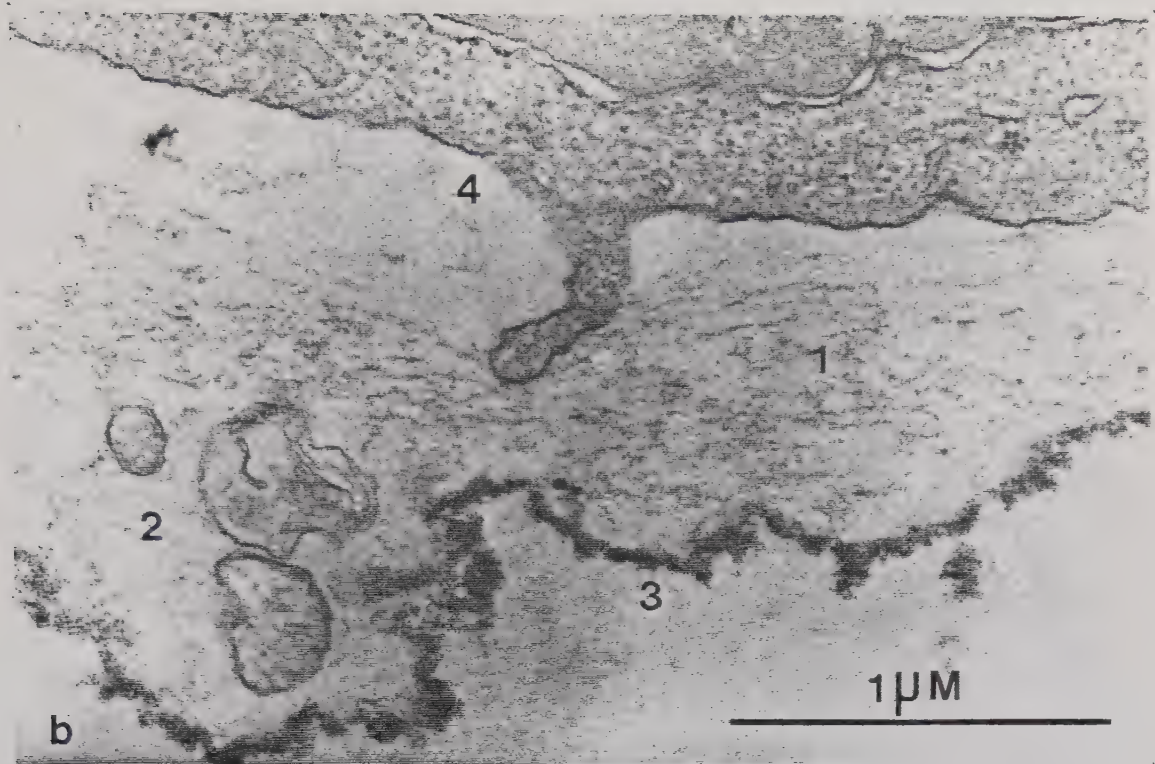


Abbildung 29.: b.) Ausschnitt von a.) (Kasten 4.)

Zelldetritus, bestehend aus 1. amorphem Material und 2. ehemaligen Zellorganellen, 3. membranartiger Grenzbezirk mit dichtem Fe^+ -Besatz, 4. Fe^+ freie Zellmembran

aufwies (Abb. 31 a u. b). Das deutet darauf hin, daß der Zelldetritus, der sich bei der Proteasebehandlung aus lysiertem Zellmaterial bildet, eine Diffusionsbarriere für den makromolekularen Marker darstellt.

Um zu prüfen, ob bei trypsinierten Zellen die gefundenen Verteilungsmuster von Fe^+ für größere Abschnitte der Zelloberfläche zutreffen, wurden Schnittserien hergestellt. Hierbei zeigte sich,

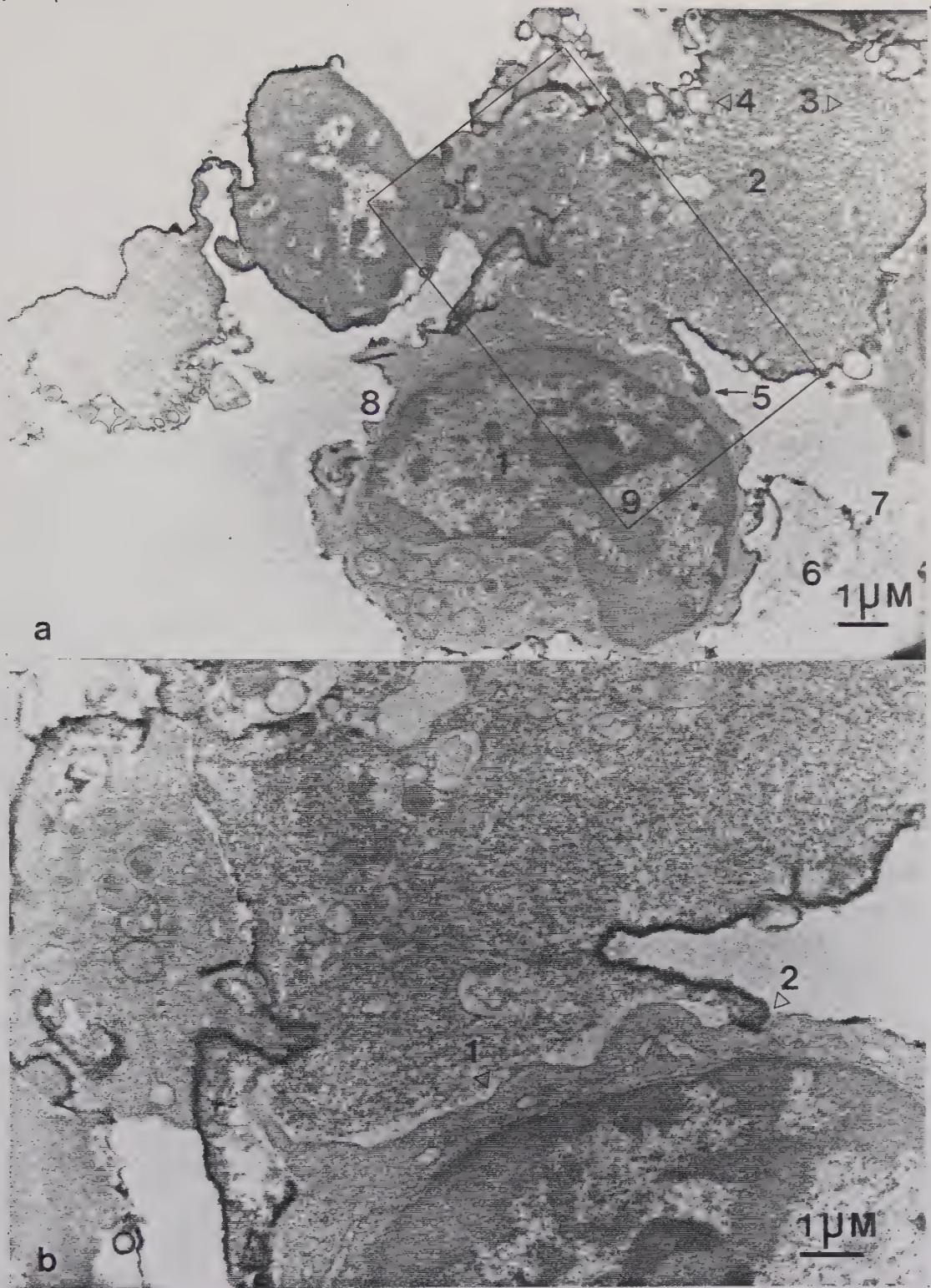


Abbildung 30.: a.) Lymphozyt, zum Teil von Zelldetritus umgeben, 30 min Trypsin-Inkubation, Markierung mit Fe^+ ohne Vorfixierung
 1. gut erhaltene Zelle, 2. Zelldetritus,

bestehend aus 3. amorphem und 4. vesikulärem Material, 5. Grenzfläche zwischen Zelldetritus und freiem Raum mit dichtem Fe^+ -Besatz, 6. fädiges Zelldetritusmaterial, welches jedoch nicht vollständig von einer membranartigen Struktur umschlossen ist (7.), 8. Zelloberfläche im freien Raum, z.T. mit häufchenförmigen Fe^+ -Aggregaten bedeckt (vgl. Abb. 28 a u. b)

b.) Ausschnitt von a.) (Kasten 9)

1. Der Oberflächenanteil, der von Zelldetritus umgeben ist, ist Fe^+ frei, 2. dichter membranartiger Abschluß zwischen Zelldetritus, Zelloberfläche und freiem Raum

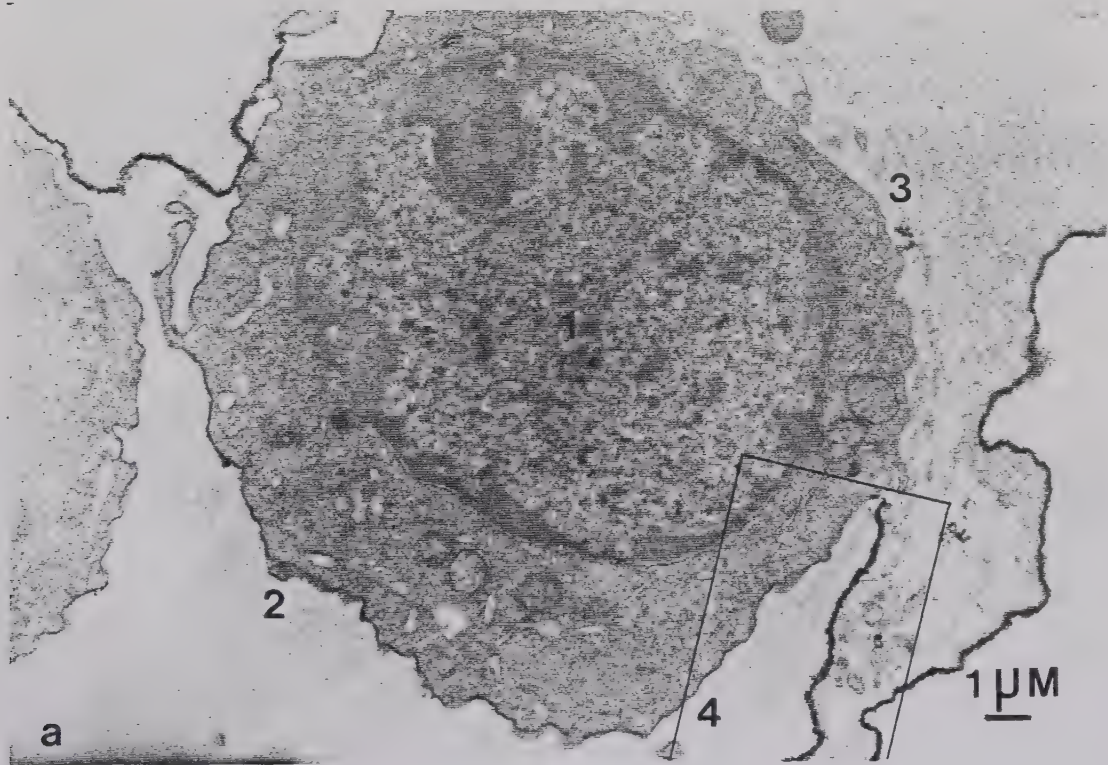


Abbildung 31.: a.) Lymphozyt, zum Teil von Zelldetritus umgeben, 30 min Trypsin-Inkubation, GA-Vorfixierung, Fe^+ -Markierung

Abbildung 31.: a.) 1. Zelle mit 2. vollständigem Fe^+ -Besatz im freien Oberflächenanteil (vgl. Abb. 26 a u. b), 3. Der Oberflächenanteil, der mit Detritus umgeben ist, ist Fe^+ frei

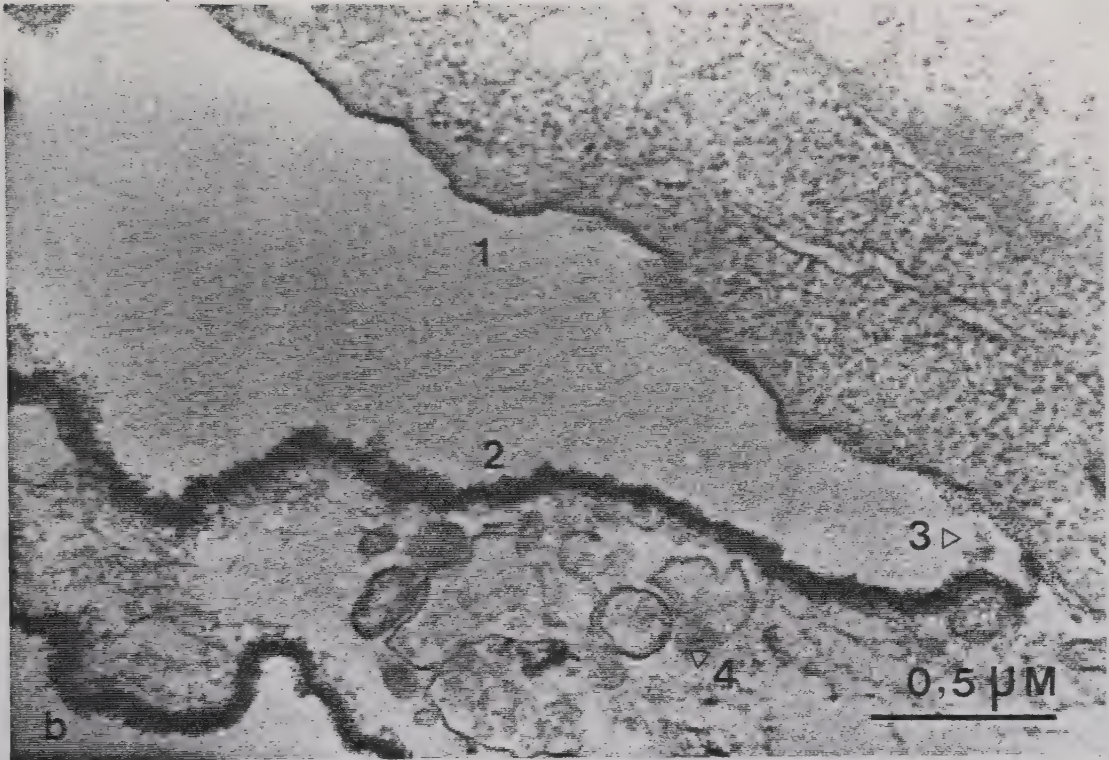
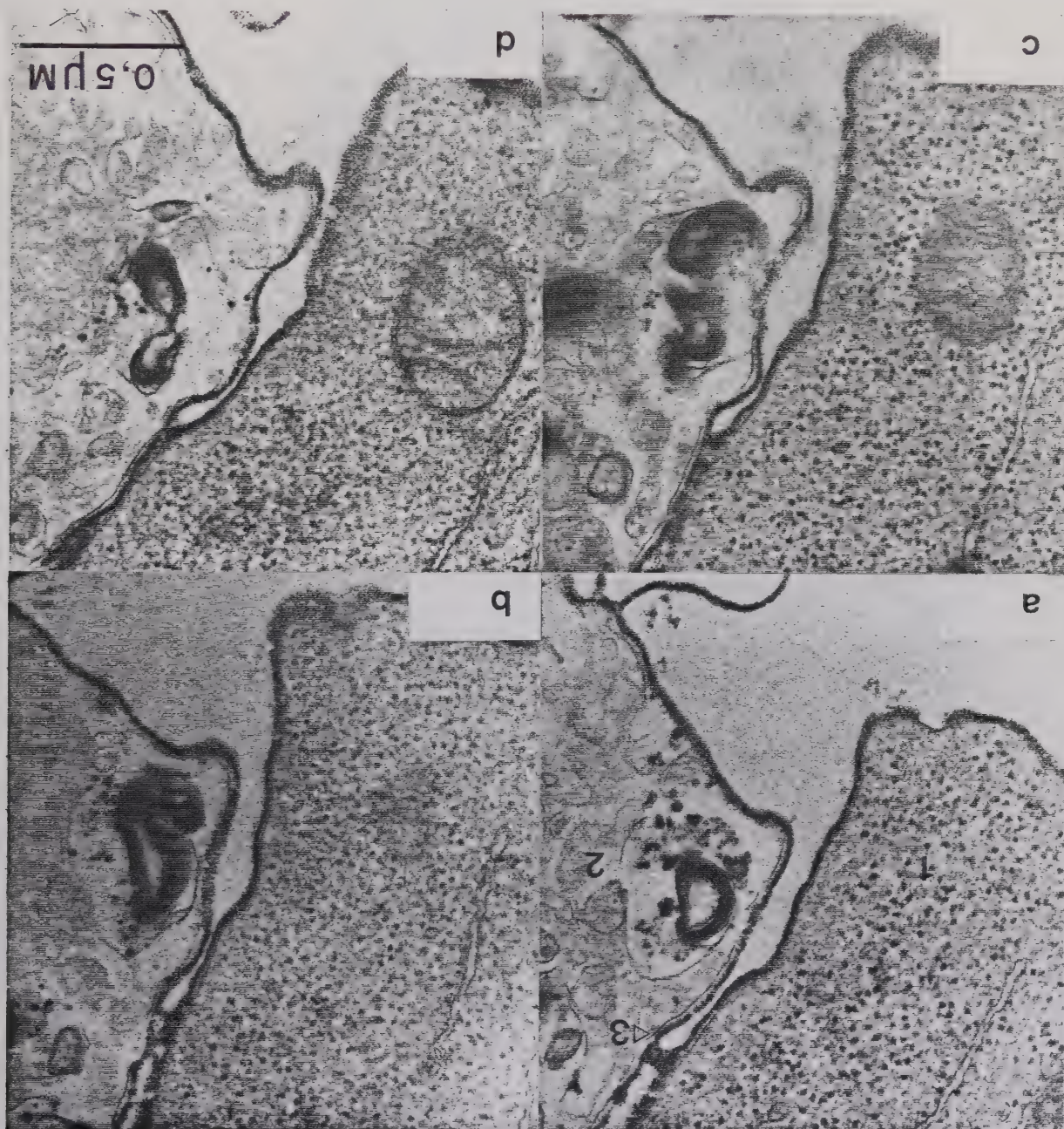


Abbildung 31.: b.) Ausschnitt von a.) (Kasten 4.)

1. vollständiger Fe^+ -Besatz auf der freien Zelloberfläche, 2. dichter Fe^+ -Besatz auf der Zelldetritusgrenzfläche, 3. Umschlagsfalte, 4. Zelldetritus mit Organellen

daß eine homogene, dem Besatzmuster entsprechende Fe^+ -Oberflächenverteilung vorliegt (Abb 32 a u. b).

Abbildung 32.: a - d.) Ausschnitt von einem Lymphozyten, Schnitt-
 serie über etwa $0,5 \mu\text{m}$, 30 min Trypsin-
 Inkubation, GA-Vorfixierung, Fe^+ -
 Markierung
 1. gut erhaltene Zelle mit in allen
 Schnittebenen vollständigem Fe^+ -Besatz,
 2. lytische Zelle mit ebenfalls in
 allen Schnittebenen vollständigem
 Fe^+ -Besatz, 3. Umschlagfalte zwischen



Fe^+ -besetzten und aufgrund der
sterischen Hinderung nicht besetzten
Oberflächenbereichen

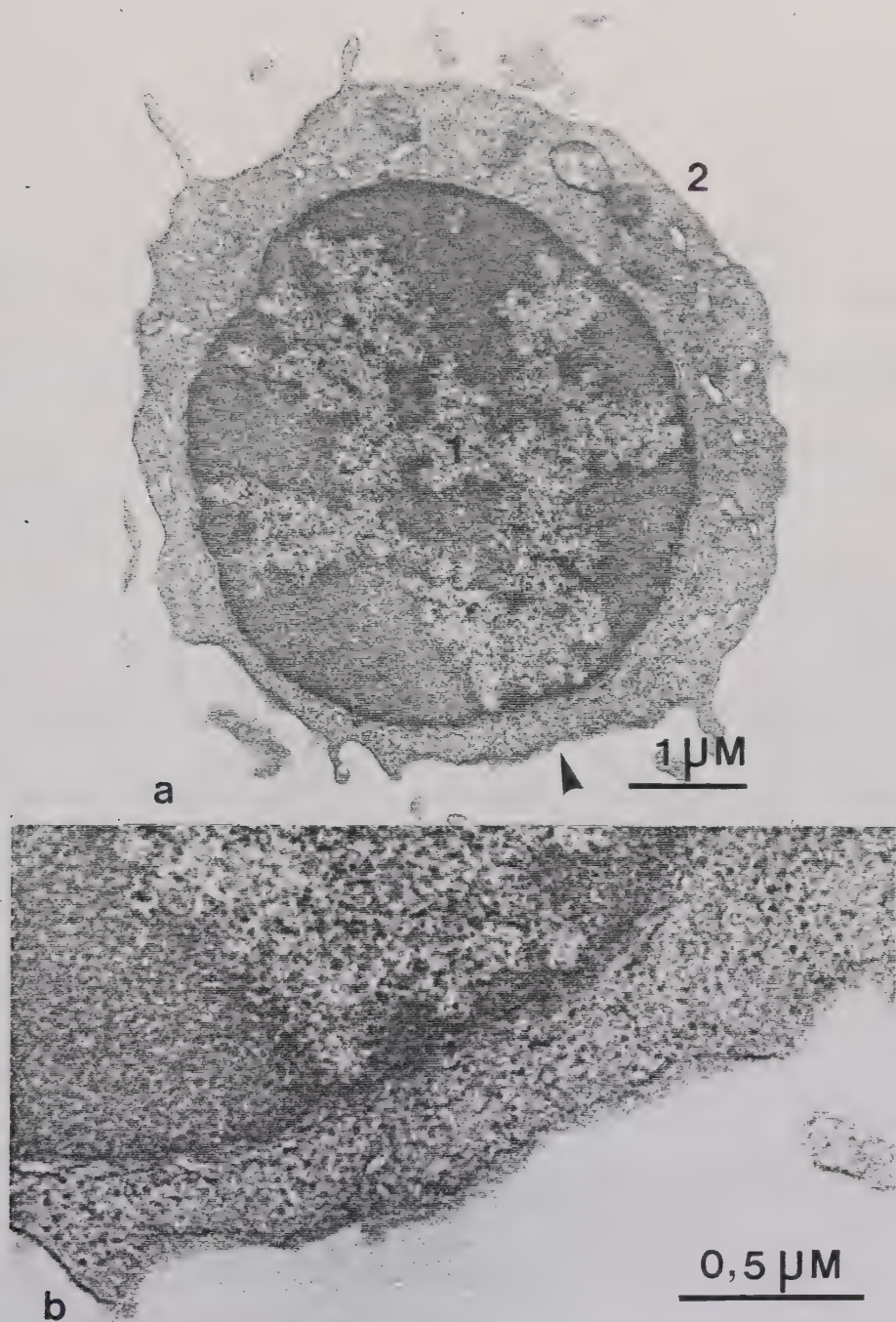


Abbildung 33.: a.) Lymphozyt, GA-Vorfixierung, Markierung
mit nativem Ferritin
1. Zelle ohne jeglichen Oberflächenbe-

Abbildung 33.: a.) satz (2.)

b.) Ausschnitt von a.) (Pfeil)

Auch in der Vergrößerung sind keine Fe^{+} -
Partikel erkennbar

3.6. Kontrollen

Bei allen Versuchen wurden Kontrollen mit nativem, nicht kationisierten Ferritin durchgeführt. Es wurde nie ein Oberflächenbesatz gefunden. Stellvertretend für die durchgeführten Kontrollen ist Abbildung 33 a u. b dargestellt.

V. Diskussion

Das einzelne Ferritinmolekül ist im Elektronenmikroskop gut erkennbar: im Positivkontrast durch seinen Eisenkern, im Negativkontrast und im Beschattungspräparat durch Form und Größe. Der Partikeldurchmesser wird in elektronenmikroskopischen Arbeiten (HAHN und BAUMEISTER, 1974), in Untersuchungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (BIELIG et al., 1966) und in Röntgenstrukturuntersuchungen (HARRISON, 1963) übereinstimmend mit 12 - 12,5 nm angegeben. Partikeldichten sind somit im Elektronenmikroskop einfach zu bestimmen.

Durch Einführung von zusätzlichen freien Aminogruppen (DANON et al., 1972) am Ferritinmolekül läßt sich dessen positive Ladungsdichte erhöhen. Das Polykation bindet bei physiologischem pH-Wert an die negativen Festladungen von Zelloberflächen und intrazellulären Membranen und wird aufgrund seiner guten Erkennbarkeit zur elektronenmikroskopischen Charakterisierung des Ladungsmusters von Zelloberflächen eingesetzt, indem eine Topographie von Teilchendichten auf der Zelloberfläche erstellt wird. Eine Zusammenstellung relevanter Arbeiten findet sich bei SKUTELSKY und BAYER, 1980.

Aus den bisher publizierten Arbeiten wird deutlich, daß sich ein breites Anwendungsspektrum für die Ferritinreaktion finden

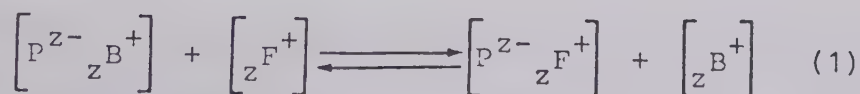
ließe, wenn es gelänge, den Nachweis der negativen Festladungen auf eine quantitative Basis zu stellen und unterschiedliche Ladungsgruppen zu differenzieren. Eine Charakterisierung der Ferritinbindungsreaktion fehlt jedoch, so daß zur Zeit die Frage, welche Informationen tatsächlich aus dem Meßparameter der Teilchendichte über Zahl, Art und Verteilung der negativen Festladungen gezogen werden können, berechtigt zur Diskussion gestellt werden kann.

Diese Frage erfordert zunächst Überlegungen zum Reaktionsablauf.

Im folgenden stellen wir ein Reaktionsmodell zur Diskussion und versuchen auf diesem Hintergrund die Reaktionsbedingungen zu beschreiben und die zur Zeit vorliegenden Befunde aus der Literatur sowie die Ergebnisse der eigenen Arbeit einzuordnen.

Wir sind zunächst von den gut untersuchten Reaktionen zwischen anionischen Kolloiden und Makromolekülen mit anorganischen Kationen respektive mit basischen Farbstoffen ausgegangen (BOOIJ und BUNGENBERG de JONG, 1956; SCOTT, 1967, 1970, 1972).

Die Reaktion eines basischen Farbstoffes mit den negativ geladenen Gruppen eines Makromoleküls läßt sich als Ionenaustausch beschreiben:



wobei P^{z-} ein Polyanion, ${}_zB^+$ die Gegenionen und ${}_zF^+$ den basischen Farbstoff darstellen. Im Reaktionsgleichgewicht, das sich bei den oben genannten Reaktionspartnern sehr schnell einstellt, ergibt sich das Ausmaß des Ionenaustausches " E " auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes:

$$E = \frac{\left[\frac{P^{z-}}{{}_zF^+} \right]}{\left[\frac{P^{z-}}{{}_zB^+} \right]} = K \cdot \left[\frac{[F^+]}{[B^+]} \right]^z \quad (2)$$

Daraus folgt, daß " E " von dem Verhältnis $\frac{[F^+]}{[B^+]}$ abhängig ist. Im Hinblick darauf wurden beispielsweise von SCOTT (1967, 1970, 1972) kritische Elektolytkonzentrationen (CEC) für verschiedene basische Farbstoffe und Glykosaminglykane sowie Polynukleotide bestimmt, oberhalb welcher bei konstanter Farbstoffkonzentration keine Farbkomplexbildung mehr nachweisbar ist. Die Messungen zeigen je nach Anionentypus ($P^{z-} = \text{OSO}_3^-, \text{CO}_2^-, \text{PO}_4^-$) eine definierte CEC für ein bestimmtes Farbstoff/Gegenionen-Paar $\frac{[F^+]}{[B^+]}$ und zwar in Abhängigkeit von der Valenz, dem Ionenradius und der Polarisierbarkeit des Gegenions. SCOTT bewertet die CEC für einen bestimmten Farbstoff als relatives Maß für dessen Affinität zu einem bestimmten Anionentypus. Diese an Modellsubstanzen gewonnenen Ergebnisse erlangen praktische Bedeutung, wenn sie gezielt in Experimenten zur Austestung spezifischer Färbemethoden verwendet werden. Ioneneffekte dieser Art stehen

zum Beispiel im Zusammenhang mit der Metachromasie verschiedener Gewebe (z.B. LANDSMEER, 1958).

Für die Reaktion von kationisiertem Ferritin mit den negativen Festladungen der Zelloberfläche scheint es vernünftig, im Prinzip von einem gleichen Reaktionsmodell auszugehen. Dafür sprechen auch folgende Befunde:

(1) Da bei physiologischem pH-Wert nur mit dem polykationisierten Ferritin eine Ferritinbindung an die Zelloberfläche nachweisbar ist, nicht jedoch mit dem nativen Ferritin, bei pH-Werten unter 4 dagegen auch mit nativem Ferritin eine Bindung an die Zelloberfläche erfolgt (NACHMIAS und MARSHALL, 1961), ist anzunehmen, daß elektrostatische Effekte bei der Bindung dominieren.

(2) Wie Versuche dieser Arbeit zeigen, verursacht ein Eingriff in das Verhältnis $\frac{[F^+]}{[B^+]}$ einen deutlichen Einfluß auf das Ausmaß der Ferritinbindung.

Bei gleichbleibender Gegenionenkonzentration ist die Abhängigkeit der Ferritinbindung von der Ferritinkonzentration nachweisbar. Wie wir zeigen konnten, ist an Latexpartikeln, bei denen von einem einheitlichen Anionentypus ausgegangen werden kann, ein linearer Anstieg der Fe^+ -Partikeldichte in Abhängigkeit von der Fe^+ -Konzentration zu messen. Bei hohen Fe^+ -Konzentrationen (über 0,3mg/ml) zeichnet sich eine Substratsättigung ab. Umgekehrt ist

Tabelle 5

Ladungstypus	Lymphozyten		Thrombozyten	
	Anzahl/ Zelle($\times 10^7$)	Fläche/La- dungsgruppe (nm)	Anzahl/ Zelle($\times 10^7$)	Fläche/La- dungsgruppe (nm)
-Carboxyl- (Neuraminidase- empfindl. N-Acetyl- Neuraminsäuren)	29,2	38,8	-	29,8-32
Phosphat- (Ribonuklease- empfindl.)	8,7	130	-	-
Phosphat- alkal. Phospha- tase empfindl.)	-	-	5,0	57
nicht identifiziert	55,5	20,5	6,5	43
ges. negative Ladungen	93,4	12	20,5	9,5
Aminogruppen (protoniert)	-	119	-	117
SH-Gruppen	-	57,6	-	103

Die Werte wurden in gekürzter Form von MEHRISHI, 1972, übernommen. Sie sind unter der hypothetischen Annahme einer statistischen Gleichverteilung der geladenen Gruppen auf der Zelloberfläche berechnet. Die mittlere Oberfläche von Lymphozyten beträgt $113 \mu\text{m}^2$, von Thrombozyten $28,27 \mu\text{m}^2$.

bei gleichbleibender Fe^+ -Konzentration und Erhöhung der Gegen-
 ionenkonzentration eine Verdrängung der Fe^+ -Bindung erzielbar.
 Wir konnten bei einem Verhältnis $\frac{[\text{Fe}^+]}{[\text{NH}_4^+]} = \frac{1}{10000}$ keine Fe^+ -
 Bindung mehr erzielen (siehe S. 58 ff).

Seitens der Zelloberfläche lassen sich für die Charakterisierung
 der negativen Festladungen und ihrer Verteilung die vorgegebenen
 Reaktionsbedingungen vor allem aus Messungen mittels Elektro-
 phorese abschätzen. Für die Diskussion dieser Bedingungen haben
 wir relevante Daten für Lymphozyten und Thrombozyten in der
 Tabelle 5 kurz zusammengefaßt.

Diese Werte geben eine Vorstellung von den unterschiedlichen
 Typen der anionischen Festladungen, ebenso von ihrer Anzahl
 pro Zelle. Daraus ergeben sich für die Bindung von Fe^+ an die
 Zelloberfläche folgende Aspekte: Es ist einmal zu erwarten,
 daß verschiedene Typen der anionischen Festladungen unter-
 schiedliche Affinitäten zum Fe^+ aufweisen. Auch räumliche
 Faktoren können eine Rolle spielen. Eventuell treten bei der
 Bindung auch kooperative Phänomene auf. Zum anderen läßt sich
 aus der Gesamtzahl der negativen Ladungen pro Zelle abschätzen,
 daß der Platzbedarf eines Fe^+ -Moleküls groß ist gegen den Platz-
 bedarf einer ladungstragenden Gruppe.

Unter der hypothetischen Annahme einer gleichmäßigen Verteilung

der Festladungen über die gesamte Zelloberfläche würde im Durchschnitt pro 10 nm^2 der Zelloberfläche eine negativ geladene Gruppe anzutreffen sein, im Gegensatz dazu nur etwa alle 120 nm^2 eine Aminogruppe. Demgegenüber überdeckt ein Ferritinmolekül eine Fläche von $110\text{-}120 \text{ nm}^2$. Bei Gleichverteilung der Ladungen würde somit die Fläche unterhalb eines Fe^+ -Partikels mindestens 10 negativ geladene Gruppen beinhalten.

Aus bisherigen Untersuchungen gibt es keine Anhaltspunkte dafür, welche Ladungsdichte pro ladungstragender Gruppe zur Bindung eines kationisierten Ferritinmoleküls notwendig ist. Es sind die Affinitäten der unterschiedlichen ladungstragenden Gruppen zum Polykation aus den bisher vorliegenden Daten nicht quantitativ durch Gleichgewichtskonstanten beschrieben. Daraus leiten sich die grundsätzlichen Schwierigkeiten für eine Interpretation der Versuchsergebnisse ab und lassen die Grenzen der Methode deutlich werden. Auf der Basis der derzeitigen Kenntnisse ist de facto keine quantitative lineare Beziehung zwischen der Fe^+ -Teilchendichte und der Dichte der negativen Festladungen der Zelloberfläche zu erstellen. Interpretationen sind nur auf einer qualitativen, deskriptiven Basis möglich.

Es seien anhand von zwei unterschiedlichen experimentellen Reaktionsansätzen zur Charakterisierung der negativen Festladungen

zwei Beispiele aufgeführt. Einmal wurden Zelloberflächen mit unterschiedlicher Anzahl an negativen Festladungen mit einer Fe^{+} -Konzentration, die oberhalb der Sättigungskonzentration liegt, markiert. Die Ladungsunterschiede waren entweder physiologisch oder pathologisch vorgegeben oder wurden durch chemische oder enzymatische Vorbehandlung der Zellen herbeigeführt. Bei diesen Versuchen wurden je nach Zustand bzw. Vorbehandlung der Zellen unterschiedliche Fe^{+} -Dichten beobachtet, wobei die Fe^{+} -Moleküle in der Regel gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt waren (SUBJECK und WEISS, 1975; SKUTELSKY et al, 1975; HARDY et al., 1976; KAHANE et al., 1978; KNYSZYNSKI et al., 1978). Die vergleichenden Untersuchungen zielen zwar vom Ansatz her darauf ab, Ladungsdichten zu messen. Es läßt sich aber nur im Vergleich eine Zu- oder Abnahme von Festladungen schätzen, aber keine Ladungszahlen bestimmen, da, wie oben beschrieben, die minimale Ladungsdichte zur Bindung eines Fe^{+} -Moleküls nicht bekannt ist und die Affinitätskonstanten der unterschiedlichen Festionentypen unbekannt sind.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden unterschiedliche Fe^{+} -Konzentrationen bei gleichbleibender Ladungsdichte eingesetzt. Mit diesem Ansatz wurden in Abhängigkeit von der Fe^{+} -Konzentration durchwegs inhomogene Verteilungsmuster des Fe^{+} beobachtet. Dabei wurden zum einen an der Oberfläche der ein-

zernen Zelle Zonen mit hohen Fe^+ -Dichten und niedrigen Fe^+ -Dichten unterscheidbar (GRINNELL et al., 1975; HACKENBROCK und MILLER, 1975; ANDERSON und HEIN, 1977 und eigene Befunde, siehe S.45 ff). Zum anderen unterscheiden sich auch Zelltypen in einer Mischpopulation durch unterschiedliche Fe^+ -Dichten und Verteilungsmuster (siehe zum Vergleich Lymphozyten und Thrombozyten, S.55 ff). Die Markierung der Zelloberfläche in Gegenwart geringer Fe^+ -Konzentrationen zielt vom Ansatz her darauf ab, unterschiedliche Affinitäten von Bindungsstellen zu erkennen. Ohne Kenntnis der Bindungseigenschaften läßt sich jedoch auch hier nicht entscheiden, ob zum Beispiel erhöhte Fe^+ -Dichten an den Spitzen der Mikrovilli (siehe auch S. 56) Zonen erhöhter Ladungsdichten oder Zonen mit hochaffinen Bindungsstellen für das Fe^+ darstellen.

Unabhängig von den Bedingungen der Ionenreaktion lassen sich Verteilungsmuster des Liganden nur beurteilen, wenn mögliche Umverteilungen der mit den Liganden besetzten Bindungsstellen auszuschließen sind.

Bei einer Reihe von Zelltypen, insbesondere bei Lymphozyten, wird das Phänomen einer Liganden- induzierten Umverteilung von Membrankomponenten plus Liganden beschrieben (de PETRIS, 1977). Unabhängig vom Metabolismus der Zelle verursachen multivalente Liganden eine Segregation der Membrankomponenten inclusive der Liganden. Es entstehen Cluster bis Aggregate.

Nach Bindung von Ferritin an Zellen, die nicht vorfixiert wurden, wird ebenfalls eine Segregation beobachtet. Die Größe der Aggregate scheint vom Zelltyp abhängig zu sein (GRINNELL et al., 1975; SKUTELSKY und DANON, 1976; BORYSENKO und WOODS, 1979). Wie unsere eigenen Untersuchungen ergeben haben, ist innerhalb einer Zellsorte die Größe der Aggregate von der Temperatur unabhängig (siehe S. 47), dagegen wird ein Zeiteinfluß im Sekundenbereich diskutiert (GRINNELL et al., 1975; BORYSENKO und WOODS, 1979).

Diese Liganden-induzierte Umverteilung kann durch Fixierung der Zellen vor der Markierung mit Fe^+ unterbunden werden. Wir haben in der vorliegenden Arbeit zwei der gebräuchlichsten Fixierungsmittel verglichen: Formaldehyd und Glutardialdehyd. Ihr Einfluß auf die Fe^+ -Reaktion soll im Folgenden unter zwei Gesichtspunkten diskutiert werden: einmal bezüglich ihres Einflusses auf die Ortsverteilung der ladungstragenden Gruppen und zum anderen im Hinblick auf eine Modifizierung der Ladungseigenschaften der Zelloberfläche.

Offenbar sind für eine Immobilisierung der mit Fe^+ markierten Festladungen die Vernetzungseigenschaften des Fixans entscheidend. Glutardialdehyd ist infolge Polymerenbildung im neutralen bis basischen pH-Bereich als eines der effizientesten Vernetzungs-

reagentien beschrieben (PETERS und RICHARDS, 1977). In unseren Untersuchungen ist die Glutardialdehyd-Fixierung der Formaldehyd-Fixierung eindeutig überlegen. Glutardialdehyd unterbindet die Ausbildung von Fe^+ -Aggregaten (siehe S.50 ff, siehe hierzu auch GRINNELL et al., 1975; SKUTELSKY und DANON, 1976; eigene Befunde). Nach Formaldehyd-Fixierung ist dagegen unter den hier gewählten Bedingungen (Endkonzentration im Ansatz: 3×10^{-1} mol/l, 10 minütige Fixanseinwirkung bei RT, Auswaschen des Aldehyd-Überschusses) die Segregation noch in vollem Umfang nachweisbar. Wir nehmen daher an, daß das Fe^+ -Verteilungsmuster, das nach Glutardialdehyd-Fixierung zu beobachten ist, die ursprüngliche Ladungsverteilung besser darstellt.

Auch hierzu gibt es Einwände. GRINNELL et al. (1976) diskutieren bei kultivierten Nierenzellen von Hamstern eine von dem zweiwertigen Aldehyd induzierte "Reorganisation" von negativen Festladungen. Diese Hypothese erscheint zur Zeit experimentell noch nicht ausreichend abgesichert zu sein. Könnte jedoch tatsächlich eine derartige Wirkung des Aldehyds nachgewiesen werden, dann hätte das erhebliche Konsequenzen für jegliche Membrantopographie auf molekularer Ebene, die auf eine Fixierung von Membranbausteinen in situ angewiesen ist und auf bifunktionelle Vernetzungsreagentien zurückgreifen muß.

Die Aldehyd-Fixierung führt jedoch prinzipiell zu einer Modifizierung des Ladungsmusters der biologischen Membran. Die freien Aldehydgruppen reagieren bevorzugt mit Aminogruppen. Beim Einsatz von Glutardialdehyd kommt es im neutralen und leicht basischen pH-Bereich zur Ausbildung von stabilen Schiff's-Basen und sekundären Aminen (MONSAN et al., 1975; PETERS und RICHARDS, 1977). In der Elektrophorese läßt sich bei aldehydfixierten Zellen eine erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit feststellen (WEISS und ZEIGEL, 1971), was darauf hindeutet, daß die Zelloberfläche netto negativer geworden ist. An Modellsubstanzen wird vor und nach Fixierung Fe^+ quantitativ unterschiedlich gebunden (BURRY und WOOD, 1979). Obwohl die Ergebnisse zur Fe^+ -Bindung nach Aldehyd-Fixierung nicht völlig konsistent sind, zeichnet sich ab, daß für jede quantitative Interpretation der Aldehyd-Einfluß mit zu gewichten ist. Die Modifizierung der Zelloberfläche durch Aldehyd-Fixierung könnte unter Umständen Ursache für die Diskrepanzen zwischen Befunden mittels Elektrophorese und der Fe^+ -Markierung sein. Im Laufe der Granulozytenreifung wird zum Beispiel mittels Elektrophorese eine Abnahme der Netto-Negativität der Zelloberfläche beobachtet (LICHTMAN und WEED, 1972), nach Fe^+ -Kontrastierung der fixierten Zellen dagegen eine Zunahme der Partikeldichten (ACKERMAN, 1975),

Wir haben in der Diskussion versucht, die auffälligsten Para-

meter anzusprechen, die die Fe^+ -Reaktion dirigieren. Obwohl die qualitativ nachweisbaren Unterschiede an der Zelloberfläche ihren Informationswert besitzen, wäre eine weitergehende Charakterisierung des Ladungsmusters mit Fe^+ wünschenswert. Welche Perspektiven ergeben sich dafür?

Vorrangig wäre ein Weiterführen von Versuchen mit Modellen, die definierte Ladungsdichten und definierte Anionentypen aufweisen, um die Bindungsreaktion des Polykations zu charakterisieren. Dazu wären systematische Untersuchungen über den Einfluß des Elektrolytmilieus im Sinne der von Bungenberg de Jong aufgezeigten Ionen-Gegenionen-Wechselwirkungen mit einzubeziehen. Ausgehend von detaillierten Kenntnissen der Bindungseigenschaften des Polykations würden die Möglichkeiten einer quantitativen Charakterisierung des Ladungsmusters biologischer Membranen erst abschätzbar.

VI. Zusammenfassung

Bei der Beschreibung von Eigenschaften der Zelloberfläche interessiert der Ladungszustand, die Eigenschaften der ladungstragenden Gruppen sowie deren Verteilung. Zum morphologischen Nachweis der Ladungsträger werden u.a. Methoden benötigt, die eine Aussage über Anzahl und Verteilung ermöglichen. Kationisiertes Ferritin bietet sich aufgrund seiner Verwendbarkeit im physiologischen pH-Bereich und seiner Quantifizierbarkeit im Elektronenmikroskop als Marker für die negativ geladenen Gruppen, die die positiv geladenen Gruppen überwiegen, an.

In der vorliegenden Arbeit werden die am einflußreichsten erscheinenden experimentellen Bedingungen beim Einsatz von Fe^+ an 2 Modellen (1. menschliche Blutzellen, 2. Latexkugeln) studiert, nämlich:

- a.) die Abhängigkeit der Fe^+ -Bindung an anionische Gruppen von der Fe^+ -Konzentration sowie die Verdrängbarkeit von gebundenem Fe^+ durch Gegenionen wie NH_4^+ und RNH_2
- b.) der Einfluß der Temperatur und des Fixierungsmittels auf das Verteilungsmuster der markierten anionischen Gruppen.

Wir konnten an Latexpartikeln, bei denen von einem einheitlichen Anionentyp ausgegangen werden kann, zeigen, daß im Bereich von 0,01 mg/ml bis 0,3 mg/ml Fe^+ (Endkonzentration im Ansatz) ein

linearer Anstieg der Fe^+ -Partikeldichte in Abhängigkeit von der Fe^+ -Konzentration besteht. Bei höheren Fe^+ -Konzentrationen zeichnet sich eine Substratsättigung ab.

Bei der Inkubation der Zellen mit Fe^+ unterschiedlicher Konzentration zeigte sich je nach Zelltyp ein unterschiedliches Bindungsverhalten einschließlich Anzahl und Verteilung der Fe^+ -Partikel auf der Zelloberfläche.

Durch NH_4Cl und Methylamin ist Fe^+ aus seiner Bindung verdrängbar. Die Inkubationstemperatur (4°C , RT und 37°C) scheint beim gleichen Zelltyp keinen Einfluß auf das Verteilungsmuster von gebundenem Fe^+ zu haben.

Die Fixierungsart (unfixiert, Formaldehyd-Vorfixierung und Glutaraldehyd-Vorfixierung) scheint bei den gegebenen Versuchsbedingungen einen Einfluß auf die Fixierbarkeit der anionischen Oberflächengruppen zu haben. Unfixierte Zellen zeigen eine Segregation. Bei den vorfixierten Zellen beeinflußt das Fixans das Verteilungsmuster. FA-vorfixierte Zellen zeigen eine Segregation. Durch GA-Vorfixierung wird eine Segregation verhindert.

Bei Versuchen, die Proteine der Zelloberfläche durch Trypsinbehandlung abzubauen, zeigte sich, daß der Zelldetritus aus lysierten Zellen eine Diffusionsbarriere für den makromolekularen Marker bildet. Hierdurch wird der Vergleich mit unbehandelten Kontrollen bezüglich der Ladungsdichte erschwert.

In der Diskussion werden die Gesichtspunkte, die sich beim Einsatz

und der Verwendung von Fe^+ aus den vorliegenden Untersuchungen ergeben haben, mit den Ergebnissen aus der Literatur, die zum Teil während der Fertigstellung dieser Arbeit publiziert wurden, verglichen und diskutiert.

Literaturverzeichnis

ACKERMAN, G.A.

Surface differentiation of hemopoietic cells demonstrated ultrastructurally with cationized ferritin

Cell Tiss. Res. 159, 23 - 27, (1975)

ANDERSON, R.G.W. and HEIN, CH.E.

Distribution of anionic sites on the oviduct ciliary membrane

J. Cell Biol. 72, 482 - 492, (1977)

BACHMANN, L. und SITTE, P.

Über Schnittdickenbestimmung nach dem Tolansky-Verfahren

Intern. Kongr. EM Berlin, Bd. II, 75, (1958)

BARRANTES, F.J.

Endogeneous chemical receptors

Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8, 287 - 321, (1979)

BIELIG, H.J., KRATKY, O. and ROHNS, G.

Small-angle scattering of apoferritin in solution

Biochim. Biophys. Acta 112, 110 - 118, (1966)

BOOIJ, H.L. and BUNGENBERG DE JONG, H.G.

Biocolloids and their interactions

Photoplasmatologian Vol I, Teil 2, Eds. L.V. Heilbrunn und F. Weber, Wien, Springer Verlag, (1956)

BORYSENKO, J.Z. and WOODS, W.

Density, distribution and mobility of surface anions on a normal/transformed cell pair

Exp. Cell Res. 118, 215 - 227, (1979)

BØYUM, A.

Separation of leucocytes from blood and bone marrow

Scand. J. clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, (1968)

Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes

Tissue Antigens 4, 269 - 274, (1974)

BØYUM, A.

Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5, 9 - 15, (1976)

BURRY, R.W. and WOOD, J.G.

Contributions of lipids and proteins to the surface charge
of membranes

J. Cell Biol. 82, 726 - 741, (1979)

COOK, G.M.W., HEARD, D.H. and SEAMAN, G.V.F.

Sialic acids and the electrokinetic charge of the human
erythrocyte

Nature (London) 191, 44 - 47, (1961)

CURRAN, R.C., CLARK, A.E. and LOVELL, D.

Acid mucopolysaccharides in electron microscopy. The use
of the colloidal iron method

J. Anat. 99, 427 - 434, (1966)

DANON, D., GOLDSTEIN, L., MERIKOVSKY, Y. and SKUTELSKY, E.

Use of cationized ferritin as a label of negative charges
on cell surfaces

J. Ultrastruc. Res. 38, 500 - 510, (1972)

EYLAR, E.H., MADOFF, M.A. BRODY, O.V. and ONCLEY, J.L.

The contribution of sialic acid to the surface charge of the
erythrocyte

J. Biol. Chem. 237, 1992 - 2000, (1962)

FANKUCHEN, I.

Ferritin

V. X-ray diffraction data on ferritin and apoferritin

J. Biol. Chem. 150, 57 - 59, (1943)

FORRESTER, J.A., AMBROSE, E.J. and MC PHERSON, J.A.

Electrophoretic investigations of a clone of hamster fibro-
blasts and polyoma-transformed cells from the same population

Nature (London) 196, 1068 - 1070, (1963)

GASIC, G.J., BERWICK, L. and SORRENTINO, M.

Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stains

Lab. Invest. 18, 63 - 71, (1968)

GRINNELL, F., TOBLEMAN, M.Q. and HACKENBROCK, CH.R.

The distribution and mobility of anionic sites on the surface of baby hamster kidney cells

J. Cell Biol. 66, 470 - 479, (1976)

GRINNELL, F., ANDERSON, R.G.W. and HACKENBROCK, CH.R.

Glutaraldehyde induced alterations of membrane anionic sites

Biochim. Biophys. Acta 426, 772 - 775, (1976)

HACKENBROCK, CH.R. and MILLER, K.J.

The distribution of anionic sites on the surface of mitochondrial membranes

J. Cell Biol. 65, 615 - 630, (1975)

HAHN, M. und BAUMEISTER, W.

High resolution negative staining of ferritin molecules on vermiculite single crystal supports

Biochim. Biophys. Acta 371 (1), 267 - 274, (1974)

HARDY, B., SKUTELSKY, E., GLOBERSON, A. and DANON, D.

Ultrastructural differences between macrophages of newborn and adult mice

J. Reticuloendothel. Soc. 19, 291 - 299, (1976)

HARRISON, P.M.

The structure of apoferritin:

Molecular size, shape and symmetry from X-ray data

J. Molec. Biol. 6, 404 - 422, (1963)

KAHANE, I., POLLIACK, A., RACHMILEWITZ, E.A., BAYER, E.A. and SKUTELSKY, E.

Distribution of sialic acids on the red blood cell membrane in β -thalassaemia

Nature 271, 674 - 675, (1978)

KAHN, C.R.

Membrane receptors for hormones and neurotransmitters

J. Cell Biol. 70, 261 - 286, (1976)

- KNYSZYNSKI, A., LEIBOVICH, S.J., SKUTELSKY, E. and DANON, D.
Macrophages from unstimulated, mineral oil and thioglycolate-stimulated mice: A comparative study of surface anionic sites and phagocytosis of "old" red blood cells
J. Reticuloendothel. Soc. 24, 205 - 215, (1978)
- LANDSMEER, J.M.F.
Some colloid chemical aspects of Metachromasia
Influence of pH and salts on metachromatic phenomena evoked by toluidine blue in animal tissue
Acta Physiol. Pharmacol. Neurol. 2, 112 - 128, (1958)
- LICHTMAN, M.A. and WEED, R.J.
Alterations of the cell periphery during granulocyte maturation: Relationship to cell function
Blood 39, 301 - 316, (1972)
- MADOFF, M.A., EBBE, S. and BALDINI, M.
Sialic acid of human blood platelets
Clin. Invest. 43, 870 - 877, (1964)
- MANDEL, T., BYRT, P. and ADA, G.L.
A morphological examination of antigen reactive cells from mouse spleen and peritoneal cavity
Exp. Cell Res. 58, 179 - 182, (1971)
- MAYHEW, E. and WEISS, L.
Ribonucleic acid at the periphery of different cell types, and effect of growth rate on ionogenic groups in the periphery of cultured cells
Exp. Cell Res. 50, 441 - 453, (1968)
- MEHRISHI, J.N.
Phosphate groups (Receptors?) on the surface of human blood platelets
Nature (London) 226, 452 - 453, (1970)
- Molecular aspects of the mammalian cell surface
Progr. Biophys. Mol. Biol. 25, 1 - 68, (1972)

MONSAN, P., PUZO, G., MAZARGUIL, H.

Etudes du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-proteins

Biochimie 57, 1281 - 1292, (1975)

MOWRY, R.W.

Improved procedure for the staining of acidic polysaccharides by Müller's colloidal (hydrous) ferric oxide and its combination with the Feulgen and the periodic acid-Schiff reaction

Lab. Invest. 7, 566 - 576, (1958)

NACHMIAS, V.T. and MARSHALL, J.M.

Protein uptake by pinocytosis in amoebae: studies on ferritin and methylated ferritin

in "Dialogical structure and function", T. Gosolwin and D. Lindberg, eds., Vol 2, 605 - 619, Academic Press, N.Y., (1961)

PEACHEY, L.D.

Thin sections

I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy

J. Biophys. Cytol. 4, 233 - 242, (1958)

PETERS, K. and RICHARDS, F.M.

Chemical cross-linking; reagents and problems in studies of membrane structure

Ann. Rev. Biochem. 46, 523 - 551, (1977)

de PETRIS,

Distribution and mobility of plasma membrane components on lymphocytes

Cell Surface Rev. 3, 643 - 728, (1977)

PIPER, W.

Untersuchungen über die Wirkung des "Receptor-Destroying-Enzyme" auf menschliche Erythrozyten

Acta Haematol. 18, 414 - 428, (1957)

REYNOLDS, E.S.

The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy

J. Cell Biol. 17, 208 - 212, (1963)

RUHENSTROTH-BAUER, G. und FUHRMANN, G.F.

Die negative Überschußladung der Membran von normalen, proliferierenden und malignen Leberzellen der Ratte

Z. Naturforschg. 16 b, 252 - 254, (1961)

SACHS, L.

Angewandte Statistik

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 4. Aufl., (1974)

SCOTT, J.E.

On the mechanism of the methyl green-pyranin stain for nucleic acids

Histochemie 9, 30 - 47, (1967)

Critical electrolyte concentration effects in interaction between oxid glycosaminoglycans and organic cations and polycations

Chemistry and biology of the intercellular matrix

in "Chemistry and biology of the intercellular matrix", Balazs, ed., Vol 2, 1105 - 1119, Academic Press, London, (1970)

Histochemistry of Alcianblue.

II. The structure of Alcianblue

Histochemie 30, 215 - 234, (1972)

SEAMAN, G.V.F., VASSAR, P.S. and KENDALL, M.J.

Electrophoretic studies on human polymorphonuclear leucocytes and erythrocytes: The Binding of Calcium Ions within the peripheral regions

Archs. Biochem. Biophys. 135, 356 - 362, (1969)

SKUTELSKY, E. and BAYER, E.A.

Induced affinity in cell surface

Electron Microscopy 2,

Editors: P. Brederoo, W. de Priester, 7th Europ. Congress on Electron Microscopy, Foundation Leyden, (1980)

- " - and DANON, D.

Reduction in surface charges as an explanation of the recognition by macrophages nuclei expelled from normoblasts

J. Cell Biol. 43, 8 - 15, (1969)

SKUTELSKY, E., RUDICH, Z. and DANON, D.

Surface charge properties of the luminal front of blood vessel walls: an electron microscopical analysis

Thrombosis Res. 7, 623 - 634, (1975)

SUBJECK, J.R. and WEISS, L.

The binding of cationized ferritin at the surface of Ehrlich Ascites Tumor cells: the effect of pH and glutaraldehydfixation

J. Cell Physiol. 85, 529 - 536, (1975)

TENNANT, J.R.

Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability

Transplantation 2, 685 - 694, (1965)

THOMSON, A.E.R. and MEHRISHI, J.N.

Surface properties of normal human circulating small lymphocytes and lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia: Separation, adhesiveness and electrokinetic properties

Eur. J. Cancer 5, 195 - 206, (1969)

UHLENBRUCK, G., ROTHE, A. und PARDOE, G.I.

Bemerkenswerte chemische, serologische und elektrokinetische Phänomene bei Katzenerythrozyten: Zugleich ein Beitrag zur Bestimmung und Bedeutung von mucoid- und glykolipidgebundener Erythrozytenneuraminsäure

Z. Immunforschg. 136, 79 - 97, (1968)

VASSAR, P.S., KENDALL, M.J. and SEAMAN, G.V.F.

Electrophoresis of human leucocytes

Archs. Biochem. Biophys. 135, 350 - 355, (1969)

VENABLE, J.H. und COGGESHALL, R.

A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy

J. Cell Biol. 25, 407 - 408, (1965)

WEISS, L.

The cell periphery

Int. Rev. Cytol. 26, 63 - 105, (1969)

- " - and ZEIGEL, R.

Cell surface negativity and the binding of positively charged particles

J. Cell Physiol. 77, 179 - 186, (1971)

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 26. August 1951 als erstes Kind der Eheleute Karl und Luise Jenneßen in Rheydt geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Grundschule in Rheydt, danach bis 1970 das Städtische Gymnasium Rheydt-Odenkirchen, wo ich das Abitur ablegte.

Von 1970 bis 1972 war ich Soldat auf Zeit.

Ab 1973 studierte ich Medizin an der Universität Düsseldorf. Die Approbation wurde mir am 12. Juli 1979 erteilt.

Anschließend war ich als Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik der Städtischen Kliniken Duisburg, Leitender Arzt Professor Dr. med. R. M. Konrad , tätig. Seit Oktober 1980 bin ich Assistenzarzt an der Orthopädischen Fachklinik des Marienkrankenhauses Düsseldorf-Kaiserswerth, Leitender Arzt Dr. med. B. Maaz.

Ich bin seit 1981 verheiratet und habe eine Tochter.

Mein Dank gebührt insbesondere Frau Privat Dozent
Dr. Erika Junger für ihre fortwährende tatkräftige
Unterstützung und freundliche Geduld bei der Erstel-
lung dieser Arbeit, sowie Herrn Professor Dr. Hans
Reinauer für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten
in seiner Abteilung.

